

Weiterhin ist aus dem Stand der Technik bekannt, aus dem Gen des  $\alpha$ -Faktors, einem von Hefen produzierten Pheromon, regulative Elemente für die Steuerung der Expression heterologer Proteine in Hefen einzusetzen. So wurden beispielsweise  $\alpha$ -Faktor Signal-Leader-Peptidsequenzen zur Expression heterologer Proteine verwendet (vgl. z.  
5 B. US 5,010,182).

Aus der veröffentlichten US-Patentanmeldung US 2003/0077831 ist außerdem ein Expressionsvektor zur Expression heterologer Proteine in Hefen bekannt, welcher flankiert von geeigneten Transkriptions- und Translations-Start- bzw.  
10 Terminationssequenzen die kodierende Sequenz für ein Hybridprecursorpolypeptid umfasst, welches als Elemente das Signalpeptid und das Leaderpeptid eines von Hefen sezernierten Proteins sowie ein heterologes Protein, flankiert von N-terminalen und C-terminalen Propeptid-Sequenzen des heterologen Proteins umfasst.

15 b) Hydrophobine

Hydrophobine sind kleine, circa 100 Aminosäurereste umfassende, cysteinreiche Proteine mit interessanten technischen Eigenschaften. Sie können hydrophobe Oberflächen hydrophil machen. Hydrophile Oberflächen werden durch sie hydrophobiert.

20

Es gibt aber eine Reihe von Schutzrechten auf Hydrophobine und deren Anwendung: So beschreibt z.B. die WO-A-96/41882 Hydrophobine aus essbaren Pilzen (vgl. SEQ ID NO:21 und 22). Die WO-A-00/58342 betrifft die Reinigung von Hydrophobin-haltigen Fusionsproteinen durch Phasenextraktion. Die WO-A-01/57066 beschreibt Stabilisierung,  
25 rung, Solubilisierung und die damit verbundene bessere Anwendung von Hydrophobinen durch Sulfitbehandlung. Die WO-A-01/57076 beschreibt die Reinigung von Hydrophobin durch Adsorption an Teflon-Kügelchen und die Elution mittels Detergens, wie Tween, bei niedrigen Temperaturen. Die WO-A-01/57528 beschreibt die Fixierung von Hydrophobinen auf Oberflächen durch die Anwendung von Tween und Temperaturen bis 85 Grad Celsius.  
30

Die WO-A-01/74864 beschreibt untypische Hydrophobine (nur eine Disulfidbrücke) mit der Bezeichnung RdIA und RdIB (vgl. SEQ ID NO:19 und 20) aus filamentösen Bakterien, insbesondere Streptomyces sp. Das Hydrophobin wird zur Oberflächenbehandlung verschiedener Gegenstände, wie Fenster, Kontaktlinsen, Fahrzeugkarosserien  
35 verwendet. Weiterhin wird vorgeschlagen, die dort beschriebenen Proteine in einen rekombinanten Wirt zu produzieren, der die Proteine ins Medium abgibt. Nach Abtren-

nung des Wirts soll das Hydrophobin-haltige Medium zur Oberflächenbeschichtung geeignet sein. Experimentelle Belege für die tatsächliche Expression und Sekretion werden nicht geliefert.

## 5 Kurze Beschreibung der Erfindung

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, Mittel bereitzustellen, die es ermöglichen, in der Hefe, insbesondere *Schizosaccharomyces pombe*, exprimierte homologe oder insbesondere heterologe Proteine, aus den Hefezellen in das umgebende Medium zu  
10 sezernieren. Insbesondere sollten Mittel bereitgestellt werden, welche die Sekretion von rekombinant hergestelltem Hydrophobin aus der Wirtszelle ermöglichen.

Gelöst wird obige Aufgabe durch Bereitstellung eines Expressionskonstrukts, umfassend die kodierende Nukleinsäuresequenz für ein von Hefezellen prozessierbares  
15 Shuttlepeptidkonstrukt der allgemeinen Formel  
(Sig-SP),

enthaltend in 5'-3'-Richtung die kodierenden Nukleinsäuresequenzen für  
a) ein Signalpeptid (Sig), prozessierbar verknüpft mit  
20 b)  
wenigstens einem von den Hefezellen sezernierbaren Shuttlepeptid (SP).

Modellhaft wird die Lösung obiger Aufgabe am Beispiel des Hydrophobins DewA (Matures Protein gemäß SEQ ID NO: 14 mit kodierender Sequenz gemäß SEQ ID NO:13;  
25 Präprotein mit Signalsequenz: SEQ ID NO:16 mit kodierender Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO:15) aus *Aspergillus nidulans* als heterologem Zielprotein (Targ) veranschaulicht. Dieses Protein ist ein Vertreter der Klasse I von Hydrophobinen, d.h. von sezernierten pilzlichen Hüllproteinen mit der Befähigung zur Selbstassemblierung.

30 Insbesondere wird die für das Zielprotein (DewA) kodierende DNA-Sequenz (SEQ ID NO:13) an das 3'-terminale Ende der für ein Peptid-Pheromon aus *S. pombe* (P-Faktor; Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:6 für reifen P-Faktor) kodierende DNA Sequenz (SEQ ID NO:5 für reifen P-Faktor) fusioniert. Das entstehende Fusionsprotein enthält alle für die Sekretion des Pheromons und des daran fusionierten Zielproteins  
35 notwendigen Signalsequenzen, insbesondere das abspaltbare Signalpeptid (SEQ ID NO:4). Im Rahmen der Sekretion wird das Fusionsprotein proteolytisch prozessiert. Als

Folge wird das Pheromon (P-Faktor) (SEQ ID NO:6) und das Zielprotein (Hydrophobin; SEQ ID NO: 14) separat ins Medium sezerniert.

Der erfindungsgemäße Befund ist insofern überraschend, weil offensichtlich die eigent-  
5 lichen regulativen Elemente des P-Faktor-Präproteins (N-terminal zum reifen Phero-  
mon) nicht ausreichen, um die Sezernierung des Zielproteins durch die Hefezellen  
steuern. Erst die Verwendung eines Konstruktes, in welchem dem zu sezernierenden  
Zielprotein eine zusätzliche, co-sezernierende Proteinkomponente (das reife Phero-  
mon) prozessierbar vorgeschaltet ist, ermöglicht die gewünschte Sezernierung des  
10 Zielproteins in das Kulturmedium.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung:

a) Allgemeine Angaben

15

Die Proteinsequenzen sind in der Beschreibung und den Figuren gewöhnlich im "Ein-  
Buchstaben-Code" angegeben.

20

„Sezernierbar“ im Sinne der vorliegenden Erfindung ist ein Protein, welches von einer  
Wirtszelle, insbesondere von Hefen, intrazellulär exprimiert und über zelleigene Me-  
chanismen durch die Zellmembran aus der Zelle, vorzugsweise in das umgebende  
Medium, ausgeschieden wird.

25

„Prozessierbar“ im Sinne der vorliegenden Erfindung ist eine Protein-Vorstufe (d.h. ein  
Protein in seiner ursprünglich exprimierten Form, wie z.B. ein Präprotein, mit N-und  
/oder C-terminalen Peptidsequenzen, die im reifen prozessierten Protein nicht mehr  
vorliegen) wenn es durch proteolytische Vorgänge in und/oder außerhalb der Wirtszelle  
in die reife Form überführbar ist.

30

Eine „prozessierbare Verknüpfung“ ist dann gegeben, wenn einzelne Proteinabschnitte  
in einem zu prozessierenden Protein über Peptidbindungen verbunden sind, die von  
einem proteolytischen Enzym der Wirtszelle spaltbar sind.

35

Die „Prozessierung“ kann N-terminal und gegebenenfalls auch C-terminal zur Sequenz  
des reifen, prozessierten Proteins (Zielproteins) erfolgen.

Ein „homologes“ Zielprotein, wird zwar ursprünglich in dem erfindungsgemäß verwendeten Wirt exprimiert, ist also ein wirtseigenes Protein, wird aber aufgrund der Transformation des Wirts mit einem erfindungsgemäßen Expressionskonstrukt durch die Wirtszellen sezerniert.

5

Ein „heterologes“ Zielprotein, wird ursprünglich in dem erfindungsgemäß verwendeten Wirt nicht exprimiert, ist also kein wirtseigenes Protein, wird aber aufgrund der Transformation des Wirts mit erfindungsgemäßen Expressionskonstrukt durch die Wirtszellen sezerniert.

10

Ein „Shuttlepeptid“ ist Bestandteil eines in der erfindungsgemäß verwendeten Wirtszelle prozessierbares „Shuttlepeptidkonstrukts“. Zusammen mit einem oder mehreren prozessierbaren regulativen C- und/oder N- terminal, vorzugsweise N-terminal, damit verknüpften Peptidfragmenten, wie Signalsequenzen, Leadersequenzen, bildet es das Shuttlepeptidkonstrukt. Das Shuttlepeptid ist im Gegensatz z.B. zum Signalpeptid ein von der Wirtszelle sezerniertes Polypeptid. Die Prozessierung der regulativen Elemente erfolgt vorzugsweise intrazellulär. Die Sezernierbarkeit des Shuttlepeptids bleibt auch dann erhalten, wenn es, vorzugsweise C-terminal, mit einem Zielprotein prozessierbar fusioniert wird. Vorzugsweise erfolgt diese C-terminale Prozessierung, d.h. Abspaltung des Zielproteins, proteolytisch im Rahmen der Sekretion, z.B. während des Durchgangs durch die Zellhülle der Wirtszelle, oder im extrazellulären Raum, z.B. im umgebenden Kulturmedium, durch zelleigene, Proteasen.

15

20

Ein „Expressionskonstrukt“ oder eine „Expressionskassette“ gemäß vorliegender Erfindung umfasst, operativ verknüpft, mit der kodierenden Nukleinsäuresequenz eines prozessierbaren Shuttlepeptidkonstrukts gemäß obiger Definition, die zur Steuerung der Expression in einem speziellen Wirtssystem, wie insbesondere Hefezellen, erforderlichen Start- und Terminationssignale für Transkription und gegebenenfalls Translation. Das Expressionskonstrukt umfasst insbesondere Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. 5'- Stromaufwärts von der kodierenden Sequenz ist ein konstitutiver oder induzierbarer, nativer oder heterologer, natürlicher oder synthetischer in der Wirtszelle operabler Promotor enthalten. Das Expressionskonstrukt umfasst außerdem eine Anzahl von Restriktionsenzymchnittstellen, wie z. B. solche zur Insertion des Konstruktes in einen Expressionsvektor. Zusätzlich kann das Expressionskonstrukt ein Gen für einen selektierbaren Marker umfassen.

25

30

35

Ein „Expressionsvektor“ beschreibt ein Konstrukt, erhältlich durch Einführung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette in ein Replikon, wie z. B. in ein Plasmid, Cosmid oder einen Virus. Ein derartiger Vektor ist zur autonomen Replikation oder zur Integration in das Wirtsgenom befähigt und enthält die erforderlichen Kontrollsequenzen zur Steuerung von Transkription und gegebenenfalls Translation der erfindungsgemäßen kodierenden Nukleinsäuresequenzen für ein prozessierbares Shuttlepeptidkonstrukt gemäß obiger Definition.

b) Bevorzugte Ausführungsformen

10

Ein erster Gegenstand der Erfindung betrifft ein Expressionskonstrukt umfassend die kodierende Nukleinsäuresequenz für ein von Hefezellen prozessierbares Shuttlepeptidkonstrukt der allgemeinen Formel

(Sig-SP),

15

enthaltend in 5'-3'-Richtung die kodierenden Nukleinsäuresequenzen für

a) ein Signalpeptid (Sig), prozessierbar verknüpft mit

b) wenigstens einem von den Hefezellen sezernierbaren Shuttlepeptid (SP);

20

sowie gegebenenfalls eine oder mehrere die Prozessierung und/oder Sezernierung fördernde Nukleinsäuresequenzen, 5'- oder 3'-terminal zur kodierenden Signalpeptidsequenz.

25

Die kodierenden Sequenzen für SP und Sig befinden sich dabei im gleichen Leseraster und außerdem wird bei der Translation eine prozessierbare Sequenz zwischen C-Terminus von Sig und N-Terminus von SP ausgebildet. Diese prozessierbare Sequenz kann beispielsweise ein künstlich eingeführte, proteolytisch spaltbare natürliche oder synthetische Adaptor-Sequenz sein. Bevorzugt ist diese aber Bestandteil des C-Terminus von Sig oder N-Terminus von SP. Die Adaptor-Sequenz kann dabei so prozessiert werden, dass die gespaltene Sequenz ganz oder teilweise am C-Terminus von Sig oder N-Terminus von SP zu finden ist. Letzteres ist möglich, solange dadurch die Sezernierbarkeit von SP nicht wesentlich negativ beeinflusst, insbesondere nicht unterbunden, wird.

30

35

Insbesondere sind Gegenstand der Erfindung solche Expressionskonstrukte, kodierend für ein prozessierbares Shuttlepeptidkonstrukt, das von einem Polypeptid abgeleitet ist, das von Hefen im weitesten Sinn prozessiert wird. Insbesondere sind dies Hefen ausgewählt unter Ascomyceten. Bevorzugte Hefen sind ausgewählt unter solchen der

Klasse der Archiascomycetes, der Ordnung der Schizosaccharomycetales und besonders bevorzugt ausgewählt unter Hefen des Genus *Schizosaccharomyces*, wie *S. pombe*. Obwohl es Daten gibt, die zeigen, dass auch Minus-Zellen den P-Faktor sezernieren, ist es bevorzugt, den zum Mating-Faktor (Pheromon) passenden Stamm  
5 (also beim Plus-Faktor (P-Faktor) Plus-Zellen und beim Minus-Faktor (M-Faktor) Minus-Zellen) zu benutzen.

Das prozessierbare Shuttlepeptidkonstrukt ist insbesondere von einem Pheromon-Präprotein aus einer Hefe abgeleitet, wobei das Pheromon durch N- und C-terminale  
10 Prozessierung aus dem Präprotein entsteht. Vorzugsweise weist das Pheromon N-terminal ein durch Prozessierung abspaltbares Polypeptid auf, das insbesondere die zur Prozessierung und/oder Sezernierung des Präproteins erforderlichen Elemente, wie Signalpeptid und gegebenenfalls Leaderpeptid sowie die erforderlichen Proteaseschnittstellen umfasst.

15 Pheromone aus Pilzen sind bekannt und z.B. beschrieben sowohl für Basidiomyceten wie *Ustilago maydis* (Urban, M., Kahmann, R. and Bolker, M. (1996) The biallelic a mating type locus of *Ustilago maydis*: remnants of an additional pheromone gene indicate evolution from a multiallelic ancestor (Mol Gen Genet 250(4):414-420)) oder  
20 *Coprinopsis cinerea* (Halsall, J.R., Milner, M.J. and Casselton, L.A. (2000) Three subfamilies of pheromone and receptor genes generate multiple B mating specificities in the mushroom *Coprinus cinereus* (Genetics 154(3):1115-1123)) als auch Ascomyceten wie *Schizosaccharomyces pombe* (Imai, Y. and Yamamoto, M. (1995) The fission yeast mating pheromone P-factor: its molecular structure, gene structure,  
25 and ability to induce gene expression and G1 arrest in the mating partner (Genes Dev 8(3):328-338), Davey, J. (1992) Mating pheromones of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: purification and structural characterization of M-factor and isolation and analysis of two genes encoding the pheromone (EMBO J 11(3):951-960)), *Saccharomyces cerevisiae* (Michaelis, S. and Herskowitz, I. (1988) The a-factor  
30 pheromone of *Saccharomyces cerevisiae* is essential for mating (Mol Cell Biol 8(3):1309-1318), Kurjan, J. and Herskowitz, I. (1982) Structure of a yeast pheromone gene (MF-alpha): a putative alpha-factor precursor contains four tandem copies of mature alpha-factor (Cell 30(3):933-943)), *Kluyveromyces delphensis* (Wong, S., Fares, M.A., Zimmermann, W., Butler, G. and Wolfe, K.H. (2003) Evidence from  
35 comparative genomics for a complete sexual cycle in the 'asexual' pathogenic yeast *Candida glabrata* (Genome Biol 4(2)R10)) and *Saccharomyces kluyveri* (Egel-Mitani,

M. and Hansen, M.T. (1987) Nucleotide sequence of the gene encoding the *Saccharomyces kluyveri* alpha mating pheromone (Nucleic Acids Res 15(15)6303)).

5 Erfindungsgemäß geeignete Pheromone sind relativ kleine Peptide (wie z.B. 5 bis 40 oder 8 bis 30 Aminosäuren). Sie zeigen gewöhnlich keine signifikante Homologie in der Primärsequenz. Sie werden als Präproteine gebildet, proteolytisch prozessiert und in das Kulturmedium abgegeben.

10 Beispiele für besonders geeignete Pheromone bzw. entsprechende Präproteine sind die sogenannten P- und M-Faktoren bzw. deren Präproteine aus *S. pombe*. (vgl. Imai, Y. and Yamamoto, M. (1995) The fission yeast mating pheromone P-factor: its molecular structure, gene structure, and ability to induce gene expression and G1 arrest in the mating partner (Genes Dev 8(3):328-338), Davey, J. (1992) Mating pheromones of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: purification and  
15 structural characterization of M-factor and isolation and analysis of two genes encoding the pheromone (EMBO J 11(3):951-960), Kjaerulff, S., Davey, J. and Nielsen, O. (1994) Analysis of the structural genes encoding M-factor in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: identification of a third gene, *mfm3* (Mol Cell Biol 14(6)3895-3905)).

20 Das P-Faktor-Präprotein weist beispielsweise eine DNA-Sequenz gemäß SEQ ID NO: 9 und eine Proteinsequenz gemäß SEQ ID NO:10 auf. Das Präprotein umfasst eine N-terminale Signalpeptid-Sequenz verbrückt mit vier aufeinander folgenden durch Prozessierung trennbaren Pheromon-Peptidsequenzen (vgl. Figur 3).

25 In bevorzugten erfindungsgemäßen Konstrukten ist das prozessierbare Shuttlepeptid-konstrukt so ausgebildet, dass es ein Signalpolypeptid (Sig) enthält, das mit dem N-terminalen Ende eines C-terminal prozessierbaren Pheromonpolypeptides (Pher) prozessierbar verknüpft ist.

30 Insbesondere umfasst das Signalpolypeptid das proteolytisch abspaltbare native Signalpolypeptid (z.B. SEQ ID NO:4 kodiert von SEQ ID NO:3) des Pheromon-Präproteins oder ist damit identisch.

35 Bevorzugt ist weiterhin, dass das C-terminal prozessierte Pheromonpolypeptid eine C-terminale Proteaseschnittstelle umfasst.

Vorzugsweise umfasst das Expressionskonstrukt weiterhin die kodierende Nukleinsäuresequenz für ein homologes oder heterologes Zielprotein (Targ), prozessierbar verknüpft mit dem C-Terminus des Shuttlepeptidkonstrukts (Sig-SP).

- 5 Gegenstand der Erfindung sind bevorzugt Expressionskonstrukte der oben bezeichneten Art, umfassend die kodierende Nukleinsäuresequenz für ein von Hefezellen prozessierbares Fusionsprotein der allgemeinen Formel

Sig-L1<sub>n</sub>-Pher-L2<sub>m</sub>-Targ

10

worin

Sig, Pher und Targ wie oben definiert sind,

L1 und L2 für prozessierbare Linker oder Adaptor-Sequenzen stehen und

n und m unabhängig voneinander für 0 oder 1 stehen. Bevorzugt steht aber n für 1 und

15

m für 0.

L1 und L2 können dabei natürliche oder synthetische Linker sein. Sie umfassen zumindest eine proteolytisch prozessierbare Peptidsequenz. Gegebenenfalls können mit L1 und/oder L2 weitere, wie z.B. die Prozessierung, Sezernierung, Transkription und/oder Translation fördernde, Effektorfunktionen assoziiert sein.

20

Besonders bevorzugt sind Expressionskonstrukte, wobei die kodierende Nukleinsäuresequenz für das prozessierbare Shuttlepeptidkonstrukt eine für ein Signalpolypeptid (Sig) kodierende Sequenz gemäß SEQ ID NO: 3 oder ein funktionales Äquivalent davon, operativ verknüpft mit der für den reifen P-Faktor Pheromon (Pher) kodierenden Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO:5 oder ein funktionales Äquivalent davon umfasst.

25

Der Linker L2 ist dabei vorzugsweise nicht vorhanden. Der Linker L1 ist dagegen vorzugsweise vorgesehen und umfasst die kodierende Sequenz für ein Polypeptid gemäß den Aminosäurereste 21 bis 30 in SEQ ID NO:10. L1 verbrückt dabei das Signalpolypeptid mit dem ersten Pheromon-Baustein (Position 31 bis 57 in SEQ ID NO:10) der Prähormons. Das C-terminale Ende von L1 entspricht einer Erkennungssequenz der für die proteolytische Prozessierung erforderlichen Protease.

30

35



In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst die kodierende Nukleinsäuresequenz für das prozessierbare Shuttlepeptidkonstrukt eine Sequenz gemäß SEQ ID NO:1.

- 5 Grundsätzlich ist die gleiche Vorgehensweise auch mit Hilfe des M-Faktors - des zweiten in *S. pombe* vorkommenden Pheromons – einsetzbar und auf die Expression beliebiger homo- und heterologer Zielproteine (Targetproteine) anwendbar. Genomisch gibt es drei Gene (*mfm1*<sup>+</sup>, SEQ ID NO:42; *mfm2*<sup>+</sup>, SEQ ID NO: 45; und *mfm3*<sup>+</sup>, SEQ ID NO:48 ) welche jeweils den M-Faktor, das Pheromon der Zellen mit Minus-
- 10 Paarungstyp, kodieren. Von jedem Gen wird zunächst ein Präprotein (SEQ ID NO: 43, 46 und 49) gebildet, welches im Rahmen der Sekretion prozessiert wird. Letztlich wird der M-Faktor (YTPKVPYMC; SEQ ID NO:51), codiert von SEQ ID NO: 44, 47 bzw. 50) als reifes Pheromon in das Medium abgegeben. (vgl. Figur 9 ).
- 15 Weitere erfindungsgemäß geeignete Shuttlepeptid-Konstrukte könnten daher von den kodierenden Sequenzen gemäß SEQ ID NO:42, 45 oder 48 abgeleitet sein, welche für M-Faktor Signalpeptid, funktional verknüpft mit einem M-Faktor-Pheromon, kodieren. Nichtlimitierende Beispiele für entsprechende kodierende Shuttlepeptid-Sequenzen umfassen z.B. Nukleotidreste 1 bis 117 gemäß SEQ ID NO:42; Nukleotidreste 1 bis
- 20 123 gemäß SEQ ID NO:45; oder Nukleotidreste 1 bis 114 gemäß SEQ ID NO:48; oder davon abgeleitete funktional äquivalente Konstrukte, welche die Sekretion und Prozessierung des M-Faktor-Pheromons und eines mit dem Pheromon C-terminal und proteolytisch abspaltbar verknüpften homo- oder heterologen Zielproteins steuern. Funktionale Äquivalente können dabei die 5'-stromaufwärts von der kodierenden Sequenz des
- 25 reifen M-Faktors (SEQ ID NO:44, 47 oder 50) gelegenen Sequenzabschnitte unverändert oder abgewandelt (z.B. durch Deletion einzelner oder mehrerer Nukleinsäurereste) enthalten, und somit für ein in seiner Aminosäuresequenz verändertes Shuttlepeptid kodieren, welches die mature M-Faktor-Peptidsequenz funktional verknüpft mit einem, z.B. C-terminal verkürzten, Signalsequenzabschnitt umfasst.
- 30 Ein erfindungsgemäß exprimiertes Zielprotein (Targ) kann von jedem beliebigen prokaryotischen oder eukaryotischen Organismus, insbesondere Mensch, Tier oder Hefen, abgeleitet sein, solange es in der erfindungsgemäßen Weise als Bestandteil eines Fusionsproteins mit dem Shuttlepeptid (SP) von der Wirtszelle exprimierbar, sezernierbar
- 35 und prozessierbar ist. Das sezernierte und prozessierte Produkt kann therapeutisch nützlich sein oder andere vorteilhafte anwendungstechnische Eigenschaften besitzen. Als Beispiele für therapeutisch nützliche Proteine sind zu nennen Immunglobuline,

Peptidhormone, Wachstumsfaktoren, Lymphokine, Protease-Inhibitoren und dergleichen. Als Beispiel für Zielproteine mit anderen anwendungstechnisch interessanten Eigenschaften sind insbesondere Hydrophobine zu nennen.

- 5 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Zielprotein ein Hydrophobin, insbesondere ein Hydrophobin der Klasse I.

Typische Hydrophobine sind relativ kleine ( $100 \pm 25$  Aminosäuren) moderat hydrophobe Proteine mit einem konservierten Motiv von 8 Cysteinen ( $X_{2-38}-C-X_{5-9}-C-C-X_{11-39}-C-X_{8-23}-C-X_{5-9}-C-C-X_{6-18}-C-X_{2-13}$ ). Hydrophobine können an hydrophilen-hydrophoben Grenz-

10 flächen zu Proteinfilmen assemblieren. Solche Aggregate von Hydrophobinen der Klasse I sind in SDS unlöslich, während Aggregate der Klasse II Hydrophobine in SDS löslich sind (Wessels, J.G.H. (1997) Hydrophobins: Proteins that change the nature of the fungal surface. Adv Microb Physiol 38:1-45).

15 Erfindungsgemäß brauchbare Hydrophobine sind dabei insbesondere aus Pilzen abgeleitet, z.B. aus Ascomyceten, wie solchen der Gattung Aspergillus, insbesondere A. nidulans.

- 20 Brauchbare Hydrophobine sind auch aus dem oben genannten Stand der Technik bekannt und nicht auf solche aus Pilzen beschränkt.

Nichtlimitierende Beispiele für brauchbare Hydrophobine sind ausgewählt unter SEQ ID NO: 14 (DewA), SEQ ID NO:19 (RdIA) SEQ ID NO:20 (RdIB) SEQ ID NO:21 (HYP1)

25 SEQ ID NO:22 (HYP4) und SEQ ID NO:56 (RodA).

p52750 (DewA)

MRFIVSLLAF TAAATATALP ASAAKNKLA TSAAFKQAE GTTCNVGSIA

30 CCNSPAETNN DSLLSGLLGA GLLNGLSGNT GSACAKASLI DQLGLLALVD

HTEEGPVCKN IVACCPEGTT

NCVAVDNAGA GTKAE

q9l190 (RdIA)

35 MLKKAMVAAA AAASVIGMSA AAPQALAIG DDNGPAVANG NGAESAFGNS

ATKGDMSPQLSLVEGTLNKP CLGVEDVNVA VINLVPIQDI NVLADDLNQQ

CADNSTQAKR DGALSHVLED LSVLSANGEG R

q934f8 (RdIB)

MIKKVVAYAA IAASVMGASA AAPQAMAIG DDSGPVSANG NGASQYFGNS  
5 MTTGNMSPQM ALIQGSFNKP CIAVSDIPVS VIGLVPIQDL NVLGDDMNQQ  
CAENSTQAKR DGALAHLLD  
VSILSSNGEG GKG

HYP1\_AGABI (P49072)

10

MISRVLVAAL VALPALVTAT PAPGKPKASS QCDVGEIHCC DTQQTPDHTS  
AAASGLLGVP INLGAFLGFD CTPISVLGVG GNNCAAQPVC CTGNQFTALI  
NALDCSPVNV NL

15 HYP4\_AGABI (O43122)

MVSTFITVAK TLLVALLFVN INIVVGTTT GKHCSGPIE CCKQVMDSKS  
PQATELLTKN GLGLGVLAGV KGLVGANCSP ITAIGIGSGS QCSGQTVCCQ  
NNNFNGVVAI CTPINANV

20

RodA

LPPAHDSQFA GNGVGNKGNS NVKFPVPENV TVKQASDKCG DQAQLSCCNK  
ATYAGDTTTV DEGLLSGALS GLIGAGSGAE GLGLFDQCSK LDVAVLIGIQ  
25 DLVNQKCKQN IACCQNSPSS ADGNLIGVGL PCVALGSIL

Das RodA-Protein ist zusammen mit dem DewA-Protein Bestandteil der äußeren Sporenhülle von *A. nidulans*.

30 Gegenstand der Erfindung sind außerdem Expressionsvektoren, umfassend in operativer Verknüpfung mit wenigstens einer regulativen Nukleinsäuresequenz ein Expressionskonstrukt nach obiger Definition.

Gegenstand der Erfindung sind auch rekombinante Mikroorganismen, enthaltend, gegebenenfalls stabil in das Wirtsgenom integriert, wenigstens einen Expressionsvektor  
35 oder ein Expressionskonstrukt gemäß obiger Definition.

Ein „rekombinanter Mikroorganismus im Sinne der vorliegenden Erfindung umfasst wenigstens einen erfindungsgemäßen Expressionsvektor oder ein erfindungsgemäßes Expressionskonstrukt und ist abgeleitet von Hefen im weitesten Sinn. Insbesondere sind die Hefen abgeleitet von Ascomyceten. Bevorzugte Hefen sind ausgewählt aus der Klasse der Archiascomycetes, der Ordnung der Schizosaccharomycetales, und besonders bevorzugt ausgewählt unter Hefen des Genus Schizosaccharomyces, wie *S. pombe*.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft von Hefezellen prozessierbare Shuttlepeptidkonstrukte, abgeleitet von einem Pheromon-Präprotein aus einer Hefe, wobei das Pheromon durch N- und C-terminale Prozessierung aus dem Präprotein ableitbar und sezernierbar ist.

Bevorzugt sind solche Shuttlepeptidkonstrukte, enthaltend ein Signalpolypeptid N-terminal prozessierbar verknüpft mit dem C-terminal prozessierten Pheromonpolypeptid.

Vorzugsweise ist dabei das Signalpolypeptid das proteolytisch abspaltbare native Signalpolypeptid des Pheromon-Präproteins und das C-terminal prozessierte Pheromonpolypeptid umfasst die C-terminale Proteaseschnittstelle.

Bevorzugte Shuttlepeptidkonstrukte sind dabei abgeleitet von Pheromon-Präproteinen, aus Hefen, insbesondere Präproteinen der Faktoren P und M aus *S. pombe*. Besonders bevorzugte Shuttlepeptide umfassen eine Aminosäuresequenz nach SEQ ID NO:2 oder ein funktionales Äquivalent davon.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein Verfahren zur rekombinanten Herstellung eines Zielproteins, wobei man einen rekombinanten Mikroorganismus nach obiger Definition kultiviert, die das Zielprotein kodierende Nukleinsäuresequenz exprimiert und das in das Kulturmedium sezernierte Zielprotein, wie z.B. ein Hydrophobin gemäß obiger Definition, isoliert.

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Nukleinsäuren, kodierend für ein Shuttlepeptidkonstrukt nach obiger Definition; sowie Nukleinsäuren, kodierend für ein von Hefezellen prozessierbares, ein Zielprotein umfassendes Fusionsprotein gemäß obiger Definition.

Gegenstand der Erfindung sind auch Hydrophobine, erhältlich nach einem erfindungsgemäßen Verfahren.

5 Schließlich betrifft die Erfindung die Verwendung eines solchen Hydrophobins zur Oberflächenbehandlung, wobei man insbesondere die Oberfläche von Gegenständen, ausgewählt unter Glas, Fasern, Geweben, Leder, lackierten Gegenständen, wie z.B. Kraftfahrzeugkarosserien, Folien, Fassaden behandelt.

10 Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung von Hydrophobinen zur Oberflächenbehandlung von Fasern, Geweben und Leder.

c) Weitere Ausgestaltungen der Erfindung

15 c1) Polypeptide/Proteine

Erfindungsgemäß mit umfasst sind ebenfalls „funktionale Äquivalente“ der konkret offenbarten bzw. verwendeten Polypeptid/Proteine. Dies gilt sowohl für die intermediär gebildeten Fusionsproteine als auch deren Komponenten, d.h. Zielproteine (Targ),  
20 Shuttlepeptide (SP), wie Pheromone (Pher), aber auch für Signalpeptide (Sig) und Linker. Im folgenden wird als Oberbegriff für Polypeptid/Protein nur noch „Polypeptid“ verwendet.

„Funktionale Äquivalente“ oder Analoga der konkret offenbarten Polypeptide sind im  
25 Rahmen der vorliegenden Erfindung davon verschiedene Polypeptide, welche weiterhin die gewünschte biologische Aktivität besitzen. Analoge Shuttlepeptide sollen weiterhin dazu geeignet sein die Sezernierung und Prozessierung des Zielproteins zu steuern. Entsprechend sollen auch die funktionalen Äquivalente von Komponenten des Shuttlepeptids, wie Signalpolypeptid, Pheromon, Linker, weiterhin die erforderlichen  
30 Eigenschaften für eine effektive Sezernierung und Prozessierung des Fusionsproteins unter Freisetzung des Zielproteins aufweisen.

„Funktionale Äquivalente“ erfindungsgemäßer Polypeptide, wie Zielproteine, Shuttlepeptide, können insbesondere durch proteolytische Spaltung entstehenden Reste von  
35 natürlichen Linker- oder Adaptor-Sequenzen C-und/oder N-terminal enthalten.

Unter "funktionalen Äquivalenten" versteht man erfindungsgemäß insbesondere mutante Proteine, welche in wenigstens einer der Sequenzpositionen der oben genannten konkreten Sequenzen eine andere als die konkret genannte Aminosäure aufweisen, aber trotzdem eine der oben genannten biologischen Aktivitäten besitzen. "Funktionale Äquivalente" umfassen somit die durch eine oder mehrere Aminosäure-Additionen, -Substitutionen (vgl. Beispiele in folgender Tabelle), -Deletionen und/oder -Inversionen erhältlichen mutanten Proteine, wobei die genannten Veränderungen in jeglicher Sequenzposition auftreten können, solange sie zu einem mutanten Protein mit dem erfindungsgemäßen Eigenschaftsprofil führen.

10

Geeignete Reste für Aminosäuresubstitutionen sind z.B.:

Ursprünglicher Rest	Beispiele der Substitution
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln; His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn ; Gln
Ile	Leu; Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg ; Gln ; Glu
Met	Leu ; Ile
Phe	Met ; Leu ; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp ; Phe
Val	Ile; Leu

Funktionale Äquivalenz ist insbesondere auch dann gegeben, wenn das Aktivitätsmuster zwischen mutantern und unverändertem Polypeptid qualitativ übereinstimmen. Die bedeutet z.B. dass abgewandelte Shuttlepeptide das gleiche Zielprotein mit höherer oder niedrigerer Effizienz im gleichen Wirt exprimieren oder sezernieren; oder dass abgewandelte Zielproteine eine erhöhte oder verminderte pharmakologische Wirkung oder modifizierte anwendungstechnische Eigenschaft besitzen.

20

„Funktionale Äquivalente“ im obigen Sinne umfassen auch Präkursoren der beschriebenen Polypeptide sowie funktionale Derivate und Salze der Polypeptide. Unter dem Ausdruck „Salze“ versteht man sowohl Salze von Carboxylgruppen als auch Säureadditionssalze von Aminogruppen der erfindungsgemäßen Proteinmoleküle. Salze von Carboxylgruppen können in an sich bekannter Weise hergestellt werden und umfassen anorganische Salze, wie zum Beispiel Natrium-, Calcium-, Ammonium-, Eisen- und Zinksalze, sowie Salze mit organischen Basen, wie zum Beispiel Aminen, wie Triethanolamin, Arginin, Lysin, Piperidin und dergleichen. Säureadditionssalze, wie zum Beispiel Salze mit Mineralsäuren, wie Salzsäure oder Schwefelsäure und Salze mit organischen Säuren, wie Essigsäure und Oxalsäure sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

„Funktionale Derivate“ erfindungsgemäßer Polypeptide können an funktionellen Aminosäure-Seitengruppen oder an deren N- oder C-terminalen Ende mit Hilfe bekannter Techniken ebenfalls hergestellt werden. Derartige Derivate umfassen beispielsweise aliphatische Ester von Carbonsäuregruppen, Amide von Carbonsäuregruppen, erhältlich durch Umsetzung mit Ammoniak oder mit einem primären oder sekundären Amin; N-Acylderivate freier Aminogruppen, hergestellt durch Umsetzung mit Acylgruppen; oder O-Acylderivate freier Hydroxygruppen, hergestellt durch Umsetzung mit Acylgruppen.

„Funktionale Äquivalente“ umfassen natürlich auch Polypeptide, welche aus anderen als den konkret genannten Organismen, zugänglich sind, sowie natürlich vorkommende Varianten. Beispielsweise lassen sich durch Sequenzvergleich Bereiche homologer Sequenzregionen festlegen und in Anlehnung an die konkreten Vorgaben der Erfindung äquivalente Enzyme ermitteln.

„Funktionale Äquivalente“ umfassen ebenfalls Fragmente, vorzugsweise einzelne Domänen oder Sequenzmotive, der erfindungsgemäßen Polypeptide, welche z.B. die gewünschte biologische Funktion aufweisen.

„Funktionale Äquivalente“ sind außerdem Fusionsproteine, welche eine der oben genannten Polypeptidsequenzen oder davon abgeleitete funktionale Äquivalente und wenigstens eine weitere, davon funktionell verschiedene, heterologe Sequenz in funktioneller N- oder C-terminaler Verknüpfung (d.h. ohne gegenseitigen wesentliche funktionelle Beeinträchtigung der Fusionsproteinteile) aufweisen. Nichtlimitierende Beispiele

le für derartige heterologe Sequenzen sind z.B. Signalpeptide, Enzyme, Immunoglobuline, Oberflächenantigene, Rezeptoren oder Rezeptorliganden.

Erfindungsgemäß mit umfasst „funktionale Äquivalente“ sind Homologe zu den konkret genannten Polypeptiden. Diese besitzen wenigstens 60 %, vorzugsweise wenigstens 75% ins besondere wenigstens 85 %, wie z.B. 90%, 95% oder 99%, Homologie zu einer der konkret offenbarten Sequenzen, berechnet nach dem Algorithmus von Pearson und Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85(8), 1988, 2444-2448. Eine prozentuale Homologie eines erfindungsgemäßen homologen Polypeptids bedeutet insbesondere prozentuale Identität der Aminosäurereste bezogen auf die Gesamtlänge einer der hierin konkret beschriebenen Aminosäuresequenzen.

Im Falle einer möglichen Proteinglykosylierung umfassen erfindungsgemäße Äquivalente Polypeptide in deglykosylierter bzw. glykosylierter Form sowie durch Veränderung des Glykosylierungsmusters erhältliche abgewandelte Formen.

Homologe der erfindungsgemäßen Proteine oder Polypeptide können in an sich bekannter Weise durch Mutagenese erzeugt werden, z.B. durch Punktmutation oder Verkürzung des Proteins.

20

c2) Nukleinsäuresequenzen:

Erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenzen, insbesondere solche die für eines der obigen Polypeptide und deren funktionalen Äquivalente kodieren, umfassen einzel- und doppelsträngige DNA- und RNA-Sequenzen, wie z.B. auch cDNA und mRNA.

25

Alle hierin erwähnten Nukleinsäuresequenzen sind entweder natürlichen Ursprungs oder sind in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus Nukleotidbausteinen, wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine herstellbar.

30

Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoramiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seiten 896–897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mit Hilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989),

35



Molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

5 Gegenstand der Erfindung sind auch Nukleinsäuresequenzen, kodierend für eines der obigen Polypeptide und deren funktionalen Äquivalente, welche z.B. unter Verwendung künstlicher Nukleotidanaloga zugänglich sind.

10 Die Erfindung betrifft sowohl isolierte Nukleinsäuremoleküle, welche für erfindungsgemäße Polypeptide oder biologisch aktive Abschnitte davon kodieren, sowie Nukleinsäurefragmente, die z.B. zur Verwendung als Hybridisierungs-sonden oder Primer zur Identifizierung oder Amplifizierung von erfindungsgemäßer kodierenden Nukleinsäuren geeignet sind.

15 Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle können zudem untranslatierte Sequenzen vom 3'- und/oder 5'-Ende des kodierenden Genbereichs enthalten.

20 Ein "isoliertes" Nukleinsäuremolekül wird von anderen Nukleinsäuremolekülen abgetrennt, die in der natürlichen Quelle der Nukleinsäure zugegen sind und kann überdies im wesentlichen frei von anderem zellulären Material oder Kulturmedium sein, wenn es durch rekombinante Techniken hergestellt wird, oder frei von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien sein, wenn es chemisch synthetisiert wird.

25 Ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül kann mittels molekularbiologischer Standard-Techniken und der erfindungsgemäß bereitgestellten Sequenzinformation isoliert werden. Beispielsweise kann cDNA aus einer geeigneten cDNA-Bank isoliert werden, indem eine der konkret offenbarten vollständigen Sequenzen oder ein Abschnitt davon als Hybridisierungs-sonde und Standard-Hybridisierungstechniken (wie z.B. beschrieben in Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 30 Cold Spring Harbor, NY, 1989) verwendet werden. Überdies lässt sich ein Nukleinsäuremolekül, umfassend eine der offenbarten Sequenzen oder ein Abschnitt davon, durch Polymerasekettenreaktion isolieren, wobei die Oligonukleotidprimer, die auf der Basis dieser Sequenz erstellt wurden, verwendet werden. Die so amplifizierte Nukleinsäure kann in einen geeigneten Vektor kloniert werden und durch DNA- 35 Sequenzanalyse charakterisiert werden.

Die Erfindung umfasst weiterhin die zu den konkret beschriebenen Nukleotidsequenzen komplementären Nukleinsäuremoleküle oder einen Abschnitt davon.

Die genannten Nukleotidsequenzen ermöglichen die Erzeugung von Sonden und Primern, die zur Identifizierung und/oder Klonierung homologer Sequenzen in anderen Zelltypen und Organismen verwendbar sind. Solche Sonden bzw. Primer umfassen gewöhnlich einen Nukleotidsequenzbereich, der unter stringenten Bedingungen an mindestens etwa 12, vorzugsweise mindestens etwa 25, wie z.B. etwa 40, 50 oder 75 aufeinanderfolgende Nukleotide eines Sense-Stranges einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz oder eines entsprechenden Antisense-Stranges hybridisiert.

Weitere erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenzen sind abgeleitet von den konkret offenbarten Sequenzen und unterscheiden sich davon durch Addition, Substitution, Insertion oder Deletion einzelner oder mehrerer Nukleotide, kodieren aber weiterhin für Polypeptide mit dem gewünschten Eigenschaftsprofil.

Erfindungsgemäß umfasst sind auch solche Nukleinsäuresequenzen, die sogenannte stumme Mutationen umfassen oder entsprechend der Codon-Nutzung eines speziellen Ursprungs- oder Wirtsorganismus, im Vergleich zu einer konkret genannten Sequenz verändert sind, ebenso wie natürlich vorkommende Varianten, wie z.B. Spleißvarianten oder Allelvarianten, davon. Gegenstand sind ebenso durch konservative Nukleotidsubstitutionen (d.h. die betreffende Aminosäure wird durch eine Aminosäure gleicher Ladung, Größe, Polarität und/oder Löslichkeit ersetzt) erhältliche Sequenzen.

Gegenstand der Erfindung sind auch die durch Sequenzpolymorphismen von den konkret offenbarten Nukleinsäuren abgeleiteten Moleküle. Diese genetischen Polymorphismen können zwischen Individuen innerhalb einer Population aufgrund der natürlichen Variation existieren. Diese natürlichen Variationen bewirken üblicherweise eine Varianz von 1 bis 5 % in der Nukleotidsequenz eines Gens.

Weiterhin umfasst die Erfindung auch Nukleinsäuresequenzen, welchen mit oben genannten kodierenden Sequenzen hybridisieren oder dazu komplementär sind. Diese Polynukleotide lassen sich bei Durchmusterung von genomischen oder cDNA-Banken auffinden und gegebenenfalls daraus mit geeigneten Primern mittels PCR vermehren und anschließend beispielsweise mit geeigneten Sonden isolieren.

Unter der Eigenschaft, an Polynukleotide „hybridisieren“ zu können, versteht man die Fähigkeit eines Poly- oder Oligonukleotids unter stringenten Bedingungen an eine nahezu komplementäre Sequenz zu binden, während unter diesen Bedingungen unspezifische Bindungen zwischen nicht-komplementären Partnern unterbleiben. Dazu sollten die Sequenzen zu 70-100%, vorzugsweise zu 90-100%, komplementär sein. Die Eigenschaft komplementärer Sequenzen, spezifisch aneinander binden zu können, macht man sich beispielsweise in der Northern- oder Southern-Blot-Technik oder bei der Primerbindung in PCR oder RT-PCR zunutze. Üblicherweise werden dazu Oligonukleotide ab einer Länge von 30 Basenpaaren eingesetzt. Unter stringenten Bedingungen versteht man beispielsweise in der Northern-Blot-Technik die Verwendung einer 50 – 70 °C, vorzugsweise 60 – 65 °C warmen Waschlösung, beispielsweise 0,1x SSC-Puffer mit 0,1% SDS (20x SSC: 3M NaCl, 0,3M Na-Citrat, pH 7,0) zur Elution unspezifisch hybridisierter cDNA-Sonden oder Oligonukleotide. Dabei bleiben, wie oben erwähnt, nur in hohem Maße komplementäre Nukleinsäuren aneinander gebunden. Die Einstellung stringenter Bedingungen ist dem Fachmann bekannt und ist z.B. in Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. beschrieben.

### c3) Expressionskonstrukte und Vektoren:

20

Gegenstand der Erfindung sind außerdem Expressionskonstrukte, enthaltend unter der genetischen Kontrolle regulativer Nukleinsäuresequenzen eine für ein erfindungsgemäß zu exprimierendes Polypeptid kodierende Nukleinsäuresequenz; sowie Vektoren, umfassend wenigstens eines dieser Expressionskonstrukte.

25

Vorzugsweise umfassen solche erfindungsgemäßen Konstrukte 5'-stromaufwärts von der jeweiligen kodierenden Sequenz einen Promotor und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils operativ verknüpft mit der kodierenden Sequenz.

30

Unter einer „operativen Verknüpfung“ versteht man die sequentielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und gegebenenfalls weiterer regulativer Elemente derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

35

Beispiele für operativ verknüpfbare Sequenzen sind Targeting-Sequenzen sowie Enhancer, Polyadenylierungssignale und dergleichen. Weitere regulative Elemente um-

fassen selektierbare Marker, Amplifikationssignale, Replikationsursprünge und dergleichen. Geeignete regulatorische Sequenzen sind z.B. beschrieben in Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990).

5

Die kodierenden Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

Beispiele für brauchbare Promotoren sind die Hefepromotoren ADC1, MFalpha, AC, P-60, CYC1, GAPDH, nmt1, nmt41 und nmt81.

10

Für die Hefe *S. pombe* sind als geeignete Promotoren z.B. zu nennen: nmt1, nmt41, nmt81, adh1, fbp1, SV40 oder CaMV. Weitere Angaben unter  
(<http://pingu.salk.edu/~forsburg/vectors.html#exp>). Die Promotoren unterscheiden sich bezüglich ihrer Transkriptionsrate. Die Auswahl richtet sich nach der gewünschten Expressionshöhe. Entsprechendes gilt für andere Hefen.

15

Geeignete Hefe-Promotoren sind beispielsweise beschrieben in der veröffentlichten US-Patentanmeldung 2003/0077831, worauf hiermit ausdrücklich Bezug genommen wird.

20

Geeignet ist auch die Verwendung induzierbarer Promotoren, wie z.B. licht- und insbesondere temperaturinduzierbarer Promotoren.

25

Die genannten regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Nukleinsäuresequenzen ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, dass das Gen erst nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

30

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Expression positiv beeinflussen und dadurch erhöhen oder erniedrigen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

35

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten kodierenden Nukleotidsequenz sowie einem Terminator- oder Polyadenylierungssignal. Dazu verwendet man gängige Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J.

- 5 Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1982) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987) beschrieben sind.

10

Das rekombinante Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt wird zur Expression in einem geeigneten Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einen wirtsspezifischen Vektor inseriert, der eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., Hrsg, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985) entnommen werden. Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren, wie beispielsweise Phagen, Viren, wie SV40, CMV, Baculovirus und Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Cosmide, und lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder

20 chromosomal repliziert werden.

Als Beispiele für erfindungsgemäß geeignete Expressionsvektoren können insbesondere für die Hefe *S. pombe* geeignete Konstrukte genannt werden (siehe z.B.: <http://pingu.salk.edu/~forsburg/vectors.html#exp>).

25

Weitere Beispiele sind:

- pART1** (McLeod, M., Stein, M., and Beach, D. (1987) The product of the *mei3+* gene expressed under control of the mating type locus, induces meiosis and sporulation in fission yeast. EMBO J. 6:729-736)
- 30 **pCHY21** (Hoffman, C. S. and Winston, F. (1991). Glucose repression of transcription of the *schizosaccharomyces pombe* *fbp1* gene occurs by a camp signaling pathway. Genes Dev. 5:561-571)
- REP1, REP3, REP4** (Maundrell, K. (1990). *nmt1* of fission yeast: a highly transcribed gene completely repressed by thiamine. J. Biol. Chem. 265:10857-10864)
- 35 **REP41, REP42, REP81, REP82** (Basi, G., Schmid, E. and Maundrell, K. (1993). TATA box mutations in the *Schizosaccharomyces pombe* *nmt1* promoter affect transcription

efficiency but not the transcription start point or thiamine repressibility. Gene 123:131-136)

5 Hefe-Expressionsvektoren zur Expression in der Hefe *S. cerevisiae*, wie pYEpSec1 (Baldari et al., (1987) *Embo J.* 6:229-234), pMFa (Kurjan und Herskowitz (1982) *Cell* 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al. (1987) *Gene* 54:113-123) sowie pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Vektoren und Verfahren zur Konstruktion von Vektoren, die sich zur Verwendung in anderen Pilzen, wie filamentösen Pilzen, eignen, umfassen diejenigen, die eingehend beschrieben sind in: van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. 10 (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: *Applied Molecular Genetics of Fungi*, J.F. Peberdy et al., Hrsg., S. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge.

Weitere geeignete Expressionssysteme sind in Kapitel 16 und 17 von Sambrook, J., 15 Fritsch, E.F. und Maniatis, T., *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 beschrieben

#### c4) Rekombinante Mikroorganismen:

20

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Vektoren sind rekombinante Mikroorganismen herstellbar, welche beispielsweise mit wenigstens einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert sind und zur Produktion der erfindungsgemäßen Polypeptide eingesetzt werden können.

25

Vorteilhafterweise werden die oben beschriebenen erfindungsgemäßen rekombinanten Konstrukte in ein geeignetes Wirtssystem eingebracht und exprimiert. Dabei werden vorzugsweise dem Fachmann bekannte geläufige Klonierungs- und Transfektionsmethoden, wie beispielsweise Co-Präzipitation, Protoplastenfusion, Elektroporation, 30 retrovirale Transfektion und dergleichen, verwendet, um die genannten Nukleinsäuren im jeweiligen Expressionssystem zur Expression zu bringen. Geeignete Systeme werden beispielsweise in *Current Protocols in Molecular Biology*, F. Ausubel et al., Hrsg., Wiley Interscience, New York 1997, oder Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor 35 Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 beschrieben.

Als Wirtsorganismen sind prinzipiell alle Organismen geeignet, die eine Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, ihrer Allelvarianten, ihrer funktionellen Äquivalente oder Derivate ermöglichen. Bevorzugte Wirtsorganismen sind Hefen.

- 5 Verfahren zur Einführung von exogener DNA in Hefezellen sind aus dem Stand der Technik bekannt. Beispielsweise kann diese durch Sphäroplasten-Transformation nach Hinnen et al. (1978, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 75: 1919-1935) erfolgen.

Chemische Transformationsmethoden finden sich z.B. für *S. pombe* bei Alfa et al.

- (Alfa, C., Fantes, P., Hyams, J., McLeod, M. and Warbrick, E. (1993) Experiments with  
10 fission yeast. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York) oder für *S. cerevisiae* bei Kaiser et al. (Kaiser, C., Michaelis, S. and Mitchell, A. (1994) Methods in Yeast Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York).

In Hefen werden zur Selektion von Transformanten häufig auxotrophe Marker genutzt. Hierbei fehlt dem zu transformierenden Stamm ein Protein, welches zur Herstellung

- 15 bestimmter Stoffwechselprodukte notwendig ist. Das entsprechende aktive Protein wird durch den genutzten Vektor in die Zelle eingebracht. Häufig genutzte Marker sind Gene z.B. der Uracil-, Leucin-, Histidin- oder Tryptophan-Biosynthese.

Die Selektion erfolgreich transformierter Organismen kann durch Markergene erfolgen, die ebenfalls im Vektor oder in der Expressionskassette enthalten sind. Beispiele für  
20 solche Markergene sind Gene für Antibiotikaresistenz und für Enzyme, die eine farbgebende Reaktion katalysieren, die ein Anfärben der transformierten Zelle bewirkt.

Diese können dann mittels automatischer Zellsortierung selektiert werden. Erfolgreich mit einem Vektor transformierte Mikroorganismen, die ein entsprechendes Antibiotika-

- 25 resistenzgen (z.B. G418 oder Hygromycin) tragen, lassen sich durch entsprechende Antibiotika-enthaltende Medien oder Nährböden selektieren. Markerproteine, die an der Zelloberfläche präsentiert werden, können zur Selektion mittels Affinitätschromatographie genutzt werden.

- 30 Die Kombination aus den Wirtsorganismen und den zu den Organismen passenden Vektoren, wie Plasmide, Viren oder Phagen, wie beispielsweise Plasmide mit dem RNA-Polymerase/Promotor-System, die Phagen 8 oder : oder andere temperente Phagen oder Transposons und/oder weiteren vorteilhaften regulatorischen Sequenzen bildet ein Expressionssystem.

35

c5) Rekombinante Herstellung von Zielproteinen

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Verfahren zur rekombinanten Herstellung eines Zielproteins gemäß obiger Definition.

Der rekombinante Mikroorganismus kann nach bekannten Verfahren kultiviert und  
5 fermentiert werden. Im Einzelnen werden geeignete Kultivierungsbedingungen  
beispielsweise für *S. pombe* in Alfa *et al.* (Alfa, C., Fantes, P., Hyams, J., McLeod, M.  
and Warbrick, E. (1993) Experiments with fission yeast. Cold Spring Harbor Laboratory  
Press, New York) und Gutz *et al.* (Gutz, H., Heslot, H., Leupold, U. and Loprieno, U.  
(1974) *Schizosaccharomyces pombe*. In: Handbook of Genetics 1, pp 395-446,  
10 Plenum Press, New York) oder für *S. cerevisiae* in Kaiser *et al.* (Kaiser, C., Michaelis,  
S. and Mitchell, A. (1994) Methods in Yeast Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory  
Press, New York) beschrieben.

Die Zellen werden, falls das Zielprotein in den Kulturüberstand sezerniert wird, von  
15 diesem abgetrennt und das Zielprotein wird aus dem Überstand nach bekannten Prote-  
inisolierungsverfahren gewonnen.

Eine Aufreinigung des Zielproteins kann mit bekannten, chromatographischen Verfah-  
ren erzielt werden, wie Molekularsieb-Chromatographie (Gelfiltration), Ionenaustausch-  
20 Chromatographie, wie Q-Sepharose-Chromatographie, und hydrophobe Chroma-  
tographie, sowie mit anderen üblichen Verfahren wie Ultrafiltration, Kristallisation, Aus-  
salzen, Dialyse und nativer Gelelektrophorese. Geeignete Verfahren werden bei-  
spielsweise in Cooper, T. G., Biochemische Arbeitsmethoden, Verlag Walter de Gruy-  
ter, Berlin, New York oder in Scopes, R., Protein Purification, Springer Verlag, New  
25 York, Heidelberg, Berlin beschrieben.

Zur Erleichterung der Isolierung des rekombinanten Proteins können auch Vektorsys-  
teme verwendet werden, die für veränderte Polypeptide oder Fusionsproteine kodieren,  
die einer einfacheren Reinigung dienen. Derartige geeignete Modifikationen sind bei-  
30 spielsweise als Anker fungierende sogenannte "Tags", wie z.B. die als Hexa-Histidin-  
Anker bekannte Modifikation oder Epitope, die als Antigene von Antikörpern erkannt  
werden können (beschrieben zum Beispiel in Harlow, E. and Lane, D., 1988, Antibod-  
ies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor (N.Y.) Press). Diese Anker können zur  
Anheftung der Proteine an einen festen Träger, wie z.B. eine Polymermatrix, dienen,  
35 die beispielsweise in einer Chromatographiesäule eingefüllt sein kann, oder an einer  
Mikrotiterplatte oder an einem sonstigen Träger verwendet werden kann.



Gleichzeitig können diese Anker auch zur Erkennung der Proteine verwendet werden. Zur Erkennung der Proteine können außerdem übliche Marker, wie Fluoreszenzfarbstoffe, Enzymmarker, die nach Reaktion mit einem Substrat ein detektierbares Reaktionsprodukt bilden, oder radioaktive Marker, allein oder in Kombination mit den Ankern zur Derivatisierung der Proteine verwendet werden.

c6) Oberflächenbehandlung mit Hydrophobin

Die Behandlung von Oberflächen mit Hydrophobinen zur Veränderung, z.B. zur Hydrophobierung oder Hydrophilisierung, der Oberflächeneigenschaften ist prinzipiell bekannt. Sie wird nun erfindungsgemäß dadurch wesentlich vereinfacht, dass mit deren rekombinanter Herstellung der Hydrophobine ausreichend Ausgangsmaterial zur Verfügung steht.

Unter Berücksichtigung der Lehre des Standes der Technik (wie z.B. der WO-A-01/57066, die die Stabilisierung, Solubilisierung und die damit verbundene bessere Anwendung von Hydrophobinen durch Sulfitbehandlung beschreibt; der WO-A-01/57076, die die Reinigung von Hydrophobin durch Adsorption an Teflon-Kügelchen und die Elution mittels Detergens, wie Tween, bei niedrigen Temperaturen beschreibt; oder der WO-A-01/57528, die die Fixierung von Hydrophobinen auf Oberflächen durch die Anwendung von Tween und Temperaturen bis 85 Grad Celsius beschreibt) sind die unterschiedlichsten festen Materialien, wie Glas, Fasern, Geweben, Leder, lackierte Gegenständen, Folien, Fassaden, Hydrophobin-beschichtbar.

Die Erfindung wird nun durch folgende nicht-limitierende Beispiele unter Bezugnahme auf beiliegende Figuren näher beschrieben. Dabei zeigt

Figur 1 verschiedene erfindungsgemäß hergestellte Konstrukte zur Sekretion der Hydrophobine aus *S. pombe*.

Figur 2 A) die genomische Sequenz des DewA-Gens (SEQ ID NO:39); die Sequenzen der beiden Introns sind unterstrichen; B) die Aminosäuresequenz und in Klammern die entsprechende DNA-Sequenz des DewA-Proteins aus *Aspergillus nidulans*; die Signalsequenz ist fettgedruckt, die auf die Signalsequenz folgende Teilsequenz entspricht der Sequenz von maturem DewA; C) die Aminosäuresequenz und in Klammern die entsprechende DNA-Sequenz des HA-Tag.

Figur 3 A) die Aminosäuresequenz und in Klammern die entsprechende DNA-Sequenz des P-Faktor Präproteins; die Signalsequenz ist fettgedruckt; die auf die Signalsequenz folgenden unterstrichenen Teilsequenzen entsprechen den Sequenzen der vier murenen Pheromon-Peptide; das dem Signalpeptid nächstgelegene Pheromon wird als P-Faktor bezeichnet; B) Aminosäuresequenz und in Klammern die entsprechende DNA-Sequenz des abspaltbaren Signalpeptides und der sich daran anschließenden 6 Aminosäuren (unterstrichen) des P-Faktor Präproteins; C) Aminosäuresequenz und in Klammern die entsprechende DNA-Sequenz zum erfindungsgemäßen "P-Shuttle"; die Signalsequenz ist fettgedruckt die auf die Signalsequenz folgende unterstrichene Teilsequenz entspricht der Sequenz von maturem P-Faktor;

Figur 4 ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein bestehend aus der "P-Shuttle"-Sequenz (Signalsequenz fett; matures P-Protein unterstrichen), dem maturen DewA (doppelt unterstrichen) und dem C-terminal fusionierten HA-Tag (SEQ ID NO:18; kodiert von SEQ ID NO:17);

Figur 5 den immunologischen Nachweis von Hydrophobinen in *S. pombe*\*  
Die Hydrophobingene *DewA* und *RodA* aus *A. nidulans* wurden zum immunologischen Nachweis mit einem HA-tag fusioniert, in den Expressionsvektor pJR1-3XL kloniert und in *S. pombe* transformiert. "Membranfraktion" und "cytosolische Proteine" wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis in der Western-Analyse erfolgte mit HA-Antikörpern. Der Größenstandard in kDa ist links angegeben. A: aufgetragen sind Proben einer Kultur mit dem Insert-freien Vektor (pJR1-3XL, Negativkontrolle), mit einem HA-getaggten Kontroll-Protein (Positivkontrolle) sowie mit einem Vektor, der das HA-getaggte *DewA* Gen mit Introns (*DewA*-HA(+Introns)) enthält. B: aufgetragen sind jeweils Proben einer Kultur mit dem Vektor (pJR1-3XL, Negativkontrolle), mit einem Vektor, der das HA-getaggte *DewA* Gen ohne Introns (*DewA*-HA(-Introns)) bzw. das HA-getaggte *RodA* Gen mit Introns (*RodA*-HA(+Introns)) enthält.

Figur 6 den immunologischen Nachweis der Expression von Hydrophobinen in *S. pombe*. Das PDewAHA-Protein wurde in *S. pombe* exprimiert. Die Zellen wurden geerntet, der Kulturüberstand aliquotiert und ein Teil TCA-gefällt. Der Nachweis des Proteins erfolgte nach SDS-PAGE und Western-Blot mit Hilfe von HA-Antikörpern. Die mit \* gekennzeichneten Banden entsprechen dem Precursor-Protein (ca. 18 kD, obere Bande) und der maturen Form (ca. 17 kD untere Bande).

Figur 7 den Nachweis der Expression von Hydrophobinen in *S. pombe*.

- S. pombe* Zellen wurden mit Plasmiden transformiert, welche P+6DewA durch einem starken Promotor (pJR1-3XL) bzw. schwächeren Promotor (pJR1-81XL) exprimieren. Die Zellen tragen chromosomal eine Version des *prp1*-Gens mit einem c-myc-Tag. Dieses dient als Kontrolle um auszuschließen, dass der Kulturüberstand durch lysierte Zellen verunreinigt wurde. Zellen wurden geerntet (Pellet), der Kulturüberstand TCA-gefällt (Überstand). Der Nachweis der Proteine erfolgte nach SDS-PAGE und Western-Blot mit Hilfe von Antikörpern gegen HA (A) bzw. gegen c-myc (B).

Figur 8 den Nachweis der Sekretion mit Hilfe des "P-Shuttle"-Verfahrens.

- 10 *S. pombe* Zellen wurden mit Plasmiden transformiert, welche PfakDewA durch einen schwächeren Promotor (pJR1-81XL) exprimieren. Die Zellen wurden geerntet (Pellet), der Kulturüberstand TCA-gefällt (ÜS). Der Nachweis des Proteins erfolgte nach SDS-PAGE und Western-Blot mit Hilfe von Antikörpern gegen HA.
- 15 Figur 9 die drei Gene, welche jeweils den M-Faktor (SEQ ID NO:51 für maturen Faktor) aus *S. pombe* kodieren: A) Sequenzen für das *mfm1*<sup>+</sup>-Gen; B) Sequenzen für das *mfm2*<sup>+</sup>-Gen; und C) Sequenzen für das *mfm3*<sup>+</sup>-Gen.

- Figur 10 das *RodA*-Gen. Die genomische Sequenz (SEQ ID NO:52) des *RodA*-Gens enthält zwei Introns (unterstrichen), welche im entsprechenden kodierenden ORF (SEQ ID NO:53) nicht vorhanden sind. Das Präprotein (SEQ ID NO:54) enthält eine abspaltbare Signalsequenz (fett gedruckt), welche im maturen Protein (SEQ ID NO:56; kodiert von SEQ ID NO:55) fehlt.

25

#### Experimenteller Teil

Allgemeine experimentelle Angaben:

- 30 a) Allgemeine Klonierungsverfahren

- Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von *E. coli* Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden,

wenn keine abweichenden Angaben gemacht werden, wie bei Sambrook et al. (1989) a.a.O. beschrieben durchgeführt.

Die Aufreinigung von DNA aus Reaktionsgemischen oder nach Gelelektrophorese erfolgte mittels des NucleoSpin Extract Kit (Machery-Nagel, Düren) und die Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli* mit Hilfe des NucleoSpin Plasmid Quick Pure Kit (Machery-Nagel, Düren) nach den Angaben des Herstellers.

Restriktionsenzyme (Invitrogen) wurden nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Ligationen von DNA erfolgten mit Hilfe der T4-Ligase (Promega, Mannheim) nach Angaben des Herstellers.

Transformationen in *E. coli* erfolgten mittels Elektroporation mit dem Gene Pulser II Gerät (BIO-RAD, München) unter Verwendung von 2 mm Elektroporationsküvetten (Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf) nach Angaben der Hersteller. Transformanden wurden auf Ampicillin-haltigem (150 mg/l) LB Medium (Lennox, 1955, Virology, 1:190) selektiert.

#### b) Polymerasekettenreaktion (PCR)

PCR-Amplifikationen wurden mit Hilfe der Combizyme-DNA-Polymerase (Invitex, Berlin, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurden je 100 µl Reaktionsvolumen je 1 pmol der entsprechenden Primer eingesetzt.

#### c) Kultivierung

Die Kultivierung von *S. pombe* wurde wie in Alfa et al. (Alfa, C., Fantes, P., Hyams, J., McLeod, M. and Warbrick, E. (1993) Experiments with fission yeast. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York) und Gutz et al. (Gutz, H., Heslot, H., Leupold, U. and Loprieno, U. (1974) Schizosaccharomyces pombe. In: Handbook of Genetics 1, pp 395-446, Plenum Press, New York) beschrieben durchgeführt.

Die Kultivierung von rekombinanten Stämmen erfolgte wie in Alfa et al. (Alfa, C., Fantes, P., Hyams, J., McLeod, M. and Warbrick, E. (1993) Experiments with fission yeast. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York) und Gutz et al. (Gutz, H., Heslot, H., Leupold, U. and Loprieno, U. (1974) Schizosaccharomyces pombe. In: Handbook of Genetics 1, pp 395-446, Plenum Press, New York) beschrieben.

#### d) Zellaufschluss

Für rasche Expressionskontrollen wurden Zellen abzentrifugiert (5 min, 3.500xg) und  
5 das Zellpellet direkt in Laemmli-Puffer (Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural  
proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 (Nature 227:680-685))  
für die Gelelektrophorese aufgenommen.

Für den Zellaufschluss wurden Zellen durch Zentrifugation bei 3.500xg für 5 min geern-  
10 tet. Die Zellpellets wurden in 1ml 1xPBS resuspendiert und 1 Volumen Glasperlen zu-  
gegeben. Der Ansatz wurde für 5 min gevortext, der Überstand über den Glasperlen  
abgenommen.

#### e) Verwendete Organismen

15

Für Arbeiten mit *E. coli* wurden die Stämme DH5 $\alpha$  (Invitrogen), XL10-Gold (Stratage-  
ne) oder BL21 (BioLabs) verwendet.

20 Verwendete *S. pombe* Stämme sind der Spalttheke-Stammsammlung der Arbeitsgruppe  
von Prof. Dr. G. Rödel des Institutes für Genetik der Technischen Universität Dresden  
entnommen.

**Beispiel 1:** Herstellung des Expressionskonstrukts DewA und DewAHA und Klonie-  
25 rung in den Vektor pJR1-3XL

#### a) Isolierung der genomischen DNA Sequenz des DewA-Gens und Entfernung der Introns

30 Chromosomale DNA, die wie in Kaiser *et al.* (Kaiser, C., Michaelis, S. and Mitchell, A.  
(1994) Methods in Yeast Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)  
aus *A. nidulans* isoliert worden war, wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. A.  
Brakhage (Hannover) zur Verfügung gestellt.

35 Mit chromosomaler DNA als Template unter Verwendung der Primer SpDewBamrev  
und ScDewBamfor wurde das ca. 550 bp lange genomische DNA Fragment PCR  
amplifiziert.

**ScDewBamfor:**

5' - TAA TAA GGA TCC ATG CGC TTC ATC GTC TCT CTC C - 3' (SEQ ID NO:41)

**5 SpDewBamrev:**

5' - TAA TAA GGA TCC TTA CTC AGC CTT GGT ACC GGC - 3' (SEQ ID NO:28)

Das Reaktionsgemisch wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und die entsprechende DNA Bande wie oben beschrieben eluiert. Das Fragment, welches an beiden Seiten von einer *Bam*HI-Schnittstelle, welche durch die Primer eingefügt wurde, flankiert wird, wurde mit der Restriktionsendonuclease *Bam*HI (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers geschnitten und aus dem Reaktionsgemisch aufgereinigt (siehe oben).

Der Vektor pUC18 (Yanisch-Pron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of M13mp18 and pUC19 vectors. Gene 33:103) wurde ebenfalls mit *Bam*HI geschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und nachfolgend aus dem Gel eluiert (siehe oben).

Vektor und Fragment wurden ligiert (siehe oben) und die Ligationsmischung in *E. coli* transformiert. Rekombinante Plasmide wurden nach Plasmid-Präparation und anschließend Restriktionsverdau identifiziert. Die korrekte DNA-Sequenz der klonierten PCR-Produkte wurde - wie auch bei allen im Folgenden hergestellten Konstrukten - nach Klonierung durch Sequenzierung verifiziert. Sequenzierungsreaktionen wurden nach Sanger *et al.* (Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 74:5463-5467) durchgeführt. Die Sequenzierreaktionen wurden mit Hilfe des "Thermo-Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP" (Amesham Pharmacia Biotech, Freiburg) und 5'-seitig IRD800 markierten Primern (MWG Biotech AG, Ebersberg) durchgeführt. Die Auftrennung der Produkte und Sequenzauswertung erfolgte mit dem automatischen LI-COR 4000/4200 (MWG Biotech AG, Ebersberg) Sequenziersystem.

Ein Konstrukt, welches das intronhaltige, genomische *DewA*-Gen in die *Bam*HI-Schnittstelle des Vektors pUC18 kloniert enthält, wurde pDewAgen genannt.

35

Die in der genomischen DNA von *DewA* befindlichen zwei Introns (siehe genomische *DewA*-Sequenz SEQ ID NO: 39) wurden mittels „Overlap Extension PCR“ (OEP) (vgl.

Pogulis, R.J., Vallejo, A.N. and Pease, L.R. *In vitro* recombination and mutagenesis by overlap extension PCR. *Methods Mol Biol.* 1996;57:167-76) entfernt.

5     Zunächst wurden unter Verwendung von DNA des Konstruktes pDewAgen als Template mit Hilfe der Primerpaare ScDewBamfor/Dewl1rev, Dewl1for/Dewl2rev und Dewl2for/SpDewBamrev Subfragmente des offenen Leserahmes (ORF) von *DewA* PCR amplifiziert.

**ScDewBamfor:**

10     5' - TAA TAA GGA TCC ATG CGC TTC ATC GTC TCT CTC C - 3' (SEQ ID NO:41)

**Dewl1rev:**

5' - GT GTG GTC GAC GAG AGC GAG CAG ACC CAG CTG - 3' (SEQ ID NO:24)

15     **Dewl1for:**

5' - CAG CTG GGT CTG CTC GCT CTC GTC GAC CAC AC - 3' (SEQ ID NO:23)

**Dewl2rev:**

20     5' - GTC GAC GGC AAC ACA GTT GGT GGT TCC CTC - 3' (SEQ ID NO:26)

**Dewl2for:**

5' - GAG GGA ACC ACC AAC TGT GTT GCC GTC GAC - 3' (SEQ ID NO:25)

**SpDewBamrev:**

25     5' - TAA TAA GGA TCC TTA CTC AGC CTT GGT ACC GGC - 3' (SEQ ID NO:28)

30     Diese Subfragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und aufgereinigt. In der finalen PCR wurde der intronlose ORF mit den Subfragmenten als Template und den distalen Primern ScDewBamfor und SpDewBamrev amplifiziert. Das ca. 410 bp lange PCR Produkt wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, aufgereinigt und mit der Restriktionsendonuclease *Bam*HI geschnitten. Durch die distalen Primer waren entsprechende Schnittstellen eingefügt worden. Das geschnittene Fragment wurde aufgereinigt und in den ebenfalls mit *Bam*HI geschnittenen Vektor pUC18 kloniert. Vektor und Fragment wurden ligiert (siehe oben) und die Ligationmischung in *E. coli* transformiert. Rekombinante Plasmide wurden nach Plasmid-Minipräparation identifiziert und die korrekte Sequenz des klonierten ORF durch Sequenzierung verifiziert. Das so erhaltene Kon-

35

strukt (pDewAORF) diene als Template für die Konstruktion entsprechender Expressionsplamide.

- 5 b) Herstellung der Expressionskonstrukte von DewHA(+Introns) und DewHA(-Introns) und Einführung eines C-terminalen Hämagglutinin-Tags

Da keine spezifischen Antikörper gegen DewA zur Verfügung stehen, wurde zum Nachweis der heterologen Expression *DewA* mit dem HA-Epitop durch OEP fusioniert.

- 10 Zunächst wurden in den primären PCRs die Primerpaare SpDewXhofof/DewAHArev und DewAHAfor/DewAHANcorev genutzt.

**SpDewXhofof:**

5' - TAA TAA CTC GAG ATG CGC TTC ATC GTC TCT CTC C - 3' (SEQ ID NO:27)

- 15 **DewAHArev:**

5' - TCC ACG CGG AAC CAG CTC AGC CTT GGT ACC - 3' (SEQ ID NO:30)

**DewAHAfor:**

5' - GGT ACC AAG GCT GAG CTG GTT CCG CGT GGA - 3' (SEQ ID NO:29)

- 20 **DewAHANcorev:**

5' - ATT ATT CCA TGG CTA TTA GCG GCC GCA CTG AGC AGC - 3' (SEQ ID NO:31)

- Als Template für die Herstellung von DewHA(+Introns) diene DNA des Konstruktes pDewAgen, für die Herstellung von DewHA(-Introns) DNA des Konstruktes pDewA-ORF. Als Template für die PCR mit DewAHAfor/DewAHANcorev wurde der die DNA-Sequenz des HA-tag tragende Vektor yEP351HA (Kettner, K., Friederichs, S., Schlapp, T. and Rödel G (2001) Expression of a VEGF-like protein from Parapoxvirus ovis in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. Protein Expr Purif Aug;22(3):479-83) genutzt. In den finalen PCRs mittels des Primerpaares SpDewXhofof/ DewAHANcorev und den respektiven Subfragmenten erfolgte die Fusion der für das HA-Epitop kodierenden DNA an die jeweilige *DewA*-DNA. Die so amplifizierte Fragmente werden 5'-seitig von einer *XhoI* Restriktionsschnittstelle und 3'-seitig von einer *NcoI* Restriktionsschnittstelle flankiert, welche mit Hilfe der distalen Primer eingeführt wurden. Die Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, aufgereinigt und mit den Restriktionsendonucleasen *XhoI* und *NcoI* geschnitten und aus dem Reaktionsgemisch aufgereinigt.
- 25
- 30
- 35



Der Vektor pJR1-3XL (Moreno, M.B., Duran, A. and Ribas, J.C. A family of multifunctional thiamine-repressible expression vectors for fission yeast. *Yeast*. 2000 Jun 30;16(9):861-72) wurde ebenfalls mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *NcoI* geschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und aufgereinigt. Vektor und Fragment wurden ligiert (siehe oben) und die Ligationsmischung durch Elektroporation in *E. coli* transformiert. Rekombinante Plasmide wurden nach Plasmid-Minipräparation identifiziert und die korrekte Sequenz des klonierten ORF durch Sequenzierung verifiziert. In den so erhaltenen Expressionsplasmiden DewA-HA(+Introns) und DewA-HA(-Introns) steht die Expression der Fusionskonstrukte in *S. pombe* unter der Kontrolle des starken *nmt1*-Promotors.

#### c) Expression von DewA-HA(+Intron) und DewA-HA(-Intron)

Die gemäß a) und b) erhaltenen Vektoren DewA-HA(+Introns) und DewA-HA(-Introns) wurden in den *S. pombe* Wirtstamm KO103 (*h<sup>s</sup> ade6-M210 leu1-32 his7-366*) wie von Schiestl und Gietz (Schiestl, R.H. and Gietz, R.D. (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet* 16:339-346) beschrieben transformiert. Die durch die *leu1-32*-Mutation bedingte Leucin-  
auxotrophie des *S. pombe* Stammes wird durch das auf den Expressionsvektoren vorhandene *LEU2*-Gen aus *S. cerevisiae* komplementiert. Transformanden können so auf Minimalmedium ohne Leucin selektiert werden. Die Expression der Fusionsproteine in entsprechenden Hefetransformanden wurde mittels Western-Blot-Analysen untersucht.

Die Antikörper Anti-HA (Artikel 1 583 816, Anti-HA (12CA5)-mouse monoclonal Antikörper) und Anti-c-myc (Artikel 1 667 149, Anti-c-myc Antikörper) wurden von Roche Diagnostics (Mannheim) bezogen.

Hefetransformanden wurden nach der Kultivierung geerntet, mit Glasperlen aufgeschlossen und der 3.500xg Überstand der Zentrifugation abgenommen. Es wurden je 50 µg des 20.000xg Pellets ("Membranfraktion") und des Überstands ("cytosolische Proteine") aufgetragen und im SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis in der Western-Analyse erfolgte mit HA-Antikörpern. Das Ergebnis ist in Figur 5 gezeigt. Der Größenstandard in kDa ist links angegeben. In Figur 5A sind Proben einer Kultur mit dem Insert-freien Vektor (pJR1-3XL, Negativkontrolle), mit einem HA-getaggten Kontrollprotein (Positivkontrolle) sowie mit einem Vektor, der das HA-getaggte DewA Gen mit Introns (DewA-HA(+Introns)) enthält, aufgetragen. In Figur 5B sind jeweils Proben ei-

ner Kultur mit dem Vektor (pJR1-3XL, Negativkontrolle), mit einem Vektor, der das HA-getaggte *DewA* Gen ohne Introns (DewA-HA(-Introns)) bzw. das HA-getaggte *RodA* Gen mit Introns (Rod-AHA(+Introns)) enthält, aufgetragen.

- 5 Die Herstellung von RodAHA(+Introns) erfolgte in Analogie zu den Angaben von Beispiel 1a) und 1b). RodA ist ein weiteres Hydrophobin aus *A. nidulans*.

**Beispiel 2: Herstellung von Expressionsvektoren zur Sekretion des exprimierten DewA**

- 10 – Vektor enthaltend das Konstrukt PDewAHA

a) Herstellung des Konstrukts PDewAHA, enthaltend die kodierende Sequenz für das P-Faktor Signalpeptid

- 15 Um die Sekretion des Proteins aus *S. pombe* Zellen zu optimieren, wurde das authentische Sekretionssignal des *A. nidulans* Proteins, welches in der Spalthefe nicht effektiv ist, zunächst durch das abspaltbare Signalpeptid des P-Faktors aus *S. pombe* ersetzt. Der P-Faktor wird als Peptid-Pheromon von den Zellen in das Medium sezerniert. Er wird in der Zelle als Vorläuferprotein (Präprotein) bestehend aus einer abspaltbaren N-terminalen Signalsequenz, und vier P-Faktor Kopien, jeweils durch kurze Spacersequenzen getrennt, synthetisiert und durchläuft im Rahmen der Sekretion eine Reifung, darunter die Abspaltung der Signalsequenz und die proteolytische Freisetzung der vier P-Faktor Peptide.
- 20
- 25 Zunächst wurde die P-Faktor-Signalsequenz mittels PCR und genomischer DNA von *S. pombe* als Template unter Verwendung des Primerpaares SigPXhovor/PDewArev amplifiziert und das entsprechende PCR-Produkt aufgereinigt.

**SigPXhovor:**

- 30 5' - TAA TTT CTC GAG ATG AAG ATC ACC GCT GTC ATT GCC CTT TTA TTC TCA  
C - 3' (SEQ ID NO:34)

**PDewArev:**

5' - GGC AGA GGC CGG GAG TGG AAT AGG TGA GGC - 3' (SEQ ID NO:33)

- 35 Ebenfalls wurde das PCR-Produkt des Primerpaares PDewfor/DewAHANcorev und DNA des Konstruktes DewA-HA(-Introns) als Template gelelektrophoretisch aufgetrennt und aufgereinigt.

**PDewfor:**

5' - GCC TCA CCT ATT CCA CTC CCG GCC TCT GCC - 3' (SEQ ID NO:32)

**DewAHANcorev:**

5' - ATT ATT CCA TGG CTA TTA GCG GCC GCA CTG AGC AGC - 3' (SEQ ID NO:31)

Diese beiden primären PCR-Produkte wurden in der finalen PCR mit den distalen Primern SigPXhofo/DewAHANcorev als Template genutzt. Das so amplifizierte PDewAHA-Fragment wird 5'-seitig von einer *XhoI* Restriktionsschnittstelle und an seinem 3'-Ende von einer *NcoI* Restriktionsschnittstelle flankiert, welche mit Hilfe obiger Primer eingeführt wurden. In dem von diesem Fragment kodierten Fusionsprotein (PDewAHA) ist die abspaltbare Signalsequenz des *DewA* aus *A. nidulans* durch das abspaltbare Signalpeptid des P-Faktor-Vorläuferproteins ersetzt.

Das PDewAHA-Fragment wurde mit den Restriktionsendonucleasen *XhoI* und *NcoI* geschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und in den mit den gleichen Restriktionsendonucleasen geschnittenen Vektor pJR1-3XL (siehe oben) ligiert. Vektor und Fragment wurden ligiert (siehe oben) und die Ligationsmischung durch Elektroporation in *E. coli* transformiert. Rekombinante Plasmide wurden nach Plasmid-Minipräparation identifiziert und die korrekte Sequenz des klonierten ORF durch Sequenzierung verifiziert. Das erhaltene Konstrukt wurde PDewAHA genannt.

b) Expression

Die Experimente wurden in Analogie zu Beispiel 1c) durchgeführt.

Das PDewAHA-Protein wurde in *S. pombe* exprimiert. Die Zellen wurden geerntet, der Kulturüberstand aliquotiert und ein Teil TCA-gefällt. Der TCA-Niederschlag wurde in Laemmli-Puffer (Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 (Nature 227:680-685)) aufgenommen. Zellpellet, Überstand und TCA-gefällter Überstand wurden untersucht. Der Nachweis des Proteins erfolgte nach SDS-PAGE und Western-Blot mit Hilfe von HA-Antikörpern. Das Ergebnis ist in Figur 6 dargestellt. Die mit \* gekennzeichneten Banden entsprechen

dem Precursor-Protein (ca. 18 kD, obere Bande) und der maturen Form (ca. 17 kD untere Bande).

- Die Analyse ergab, dass keine effektive Sekretion zu beobachten war. Die N-terminale Fusion des abspaltbaren Signalpeptides des P-Faktors ist für eine Sekretion des fusionierten Hydrophobin nicht hinreichend.

- Beispiel 3:** Herstellung von Expressionsvektoren zur Sekretion des exprimierten DewA – Vektor enthaltend das Konstrukt P+6DewAHA

a) Herstellung des Konstrukts P+6DewAHA, enthaltend die kodierende Sequenz für das P-Faktor Signalpeptid, C-terminal verlängert um 6 Aminosäuren

- Um eine für die Sekretion möglicherweise wichtige authentische Sequenzumgebung des Signalpeptides zu gewährleisten, wurde die Sequenz des Signalpeptides im Fusionsprotein mittels OEP unter Verwendung der Primerpaare SigPXhofof/P+6DewArev und P+6DewAfof/DewAHANcorev mit DNA des Konstruktes PDewAHA als Template in den primären PCR-Reaktionen

20

**SigPXhofof:**

5' - TAA TTT CTC GAG ATG AAG ATC ACC GCT GTC ATT GCC CTT TTA TTC TCA  
C - 3' (SEQ ID NO:34)

**P+6DewArev:**

- 5' - CAC ACC AGG ATC GGC AAC TGG AAT AGG TGA GGC - 3' (SEQ ID NO:36)

**P+6DewAfof:**

5' - GTT GCC GAT CCT GGT GTG CTC CCG GCC TCT GCC - 3' (SEQ ID NO:35)

**DewAHANcorev:**

- 5' - ATT ATT CCA TGG CTA TTA GCG GCC GCA CTG AGC AGC - 3' (SEQ ID NO:31)

35

und dem Primerpaar SigPXhofof/DewAHANcorev in der finalen PCR-Reaktion um die 6 sich C-terminal anschließenden Aminosäuren erweitert (P+6DewA).

Das P+6DewA-Fragment wurde mit den Restriktionsendonucleasen *XhoI* und *NcoI* geschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und in den mit den gleichen Restriktion-

sendonucleasen geschnittenen Vektor pJR1-3XL (siehe oben) ligiert und die Ligationsmischung durch Elektroporation in *E. coli* transformiert. Rekombinante Plasmide wurden nach Plasmid-Minipräparation identifiziert und die korrekte Sequenz des klonierten ORF durch Sequenzierung verifiziert. Ebenso wurde das P+6DewA-Fragment in den Vektor pJR-81XL kloniert. Hier steht die Transkription des Fusionsgens unter der Kontrolle des schwachen *nmt81*-Promotors. Mit diesem Konstrukt sollte ein negativer Einfluss der sehr hohen Transkription in pJR1-3XL Konstrukten auf die Sekretion getestet werden.

Die entsprechenden Konstrukte wurden P+6DewA/pJR1-3XL und P+6DewA/pJR1-81XL genannt.

Die Durchführung des Experiments erfolgte in Analogie zu Beispiel 2a.

Die Klonierung der amplifizierten Sequenzen in pJR1-3XL erfolgt analog zu Beispiel 2a.

#### b) Expression

Die Expression erfolgte in Analogie zu Beispiel 2b).

*S. pombe* Zellen wurden mit den beiden Plasmiden transformiert, welche P+6DewA durch einem starken Promotor (pJR1-3XL) bzw. schwächeren Promotor (pJR1-81XL) exprimieren. Die Zellen tragen chromosomal eine Version des *prp1*-Gens mit einem c-myc-Tag. Dieses dient als Kontrolle um auszuschließen, dass der Kulturüberstand durch lysierte Zellen verunreinigt wurde. Zellen wurden geerntet (Pellet), der Kulturüberstand TCA-gefällt (Überstand). Der Niederschlag wurde in Laemmli-Puffer aufgenommen und ebenfalls analysiert. Der Nachweis der Proteine erfolgte nach SDS-PAGE und Western-Blot mit Hilfe von Antikörpern gegen HA (Figur 7A) bzw. gegen c-myc (Roche Diagnostics) (Figur 7B).

Wie man in Figur 7 sieht, ist auch diese Konstruktion für eine effektive Sekretion nicht geeignet.

**Beispiel 4:** Herstellung von Expressionsvektoren zur Sekretion des exprimierten DewA – Vektor enthaltend das Konstrukt PfakDewAHA

a) Herstellung des Konstrukts PfakDewAHA, enthaltend die kodierende Sequenz für den reifen ersten P-Faktor einschließlich dem P-Faktor-Signalpeptid

Es wurde DewAHA mittels OEP an das carboxyterminale Ende der Sequenz des matten P-Faktors fusioniert. Die in den primären PCR-Reaktionen unter Verwendung der Primerpaare SigPXhofer/PfakDewArev und genomischer DNA von *S. pombe* als Template

5

**SigPXhofer:**

5' - TAA TTT CTC GAG ATG AAG ATC ACC GCT GTC ATT GCC CTT TTA TTC TCA  
C - 3' (SEQ ID NO:34)

**PfakDewArev:**

10 5' - GGC AGA GGC CGG GAG GCG CTT TTT CAA GTT GGG TC - 3' (SEQ ID  
NO:38)

und PfakDewAfor/DewAHANcorev und DNA des Konstruktes P+6DewA/pJR1-81XL  
als Template

15

**PfakDewAfor:**

5' - AAC TTG AAA AAG CGC CTC CCG GCC TCT GCC - 3' (SEQ ID NO:37)

**DewAHANcorev:**

5' - ATT ATT CCA TGG CTA TTA GCG GCC GCA CTG AGC AGC - 3' (SEQ ID  
20 NO:31)

erhaltenen PCR-Fragmente wurden gelelektrophoretisch getrennt, aufgereinigt und als Template für die finale PCR mit Hilfe des Primerpaares SigPXhofer/ DewAHANcorev genutzt. Das so erhaltene PfakDewA-Fragment wurde mit den Restriktionsendonuc-  
25 leasen *XhoI* und *NcoI* geschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und in den mit den gleichen Restriktionsendonucleasen geschnittenen Vektor pJR1-81XL (siehe oben) ligiert. Die Ligationsmischung wurde durch Elektroporation in *E. coli* transformiert. Rekombinante Plasmide wurden nach Plasmid-Minipräparation identifiziert und die korrekte Sequenz des klonierten ORF durch Sequenzierung verifi-  
30 ziert. Ein solches Konstrukt wurde PfakDewA/pJR1-81XL genannt. In diesem Konstrukt steht die für das P-Faktor Präprotein einschließlich des ersten aminoterminalen Pheromons und die für das Hydrophobin kodierende fusionierte Sequenz. unter der Kontrolle des *nmt81* Promotors.

35

Die Durchführung des Experiments erfolgte in Analogie zu Beispiel 2a, wobei jedoch der Expressionsvektor pJR1-81XL verwendet wurde.

Die Klonierung der amplifizierten Sequenzen in pJR1-81XL erfolgte analog zu Beispiel 2a. Die amplifizierte und mit den Restriktionsendonucleasen *XhoI* und *NcoI* geschnittene DNA wurde dazu in die *XhoI* und *NcoI* Schnittstellen des Expressionsvektors pJR1-81XL kloniert.

#### b) Expression

Die Expression erfolgte in Analogie zu Beispiel 3b)

10

Die Zellen wurden pelletiert, der Kulturüberstand TCA-gefällt. Der Niederschlag wurde in Laemmli-Puffer aufgenommen und ebenfalls analysiert. Der Nachweis des Proteins erfolgte nach SDS-PAGE und Western-Blot mit Hilfe von Antikörpern gegen HA. Das Ergebnis ist in Figur 8 gezeigt. Wie man sieht wird mit Hilfe dieser Konstruktion eine effektive Sekretion des Hydrophobins in das Medium erreicht. In dem entsprechenden Fusionsprotein liegen somit alle für die Sekretion notwendigen Sequenzen des P-Faktor Präproteins in ihrem authentischen Kontext vor. Der P-Faktor selbst wird proteolytisch abgespalten.

20

#### **Beispiel 5:** Mikroskopischer Nachweis der Adsorption von exprimiertem Hydrophobin an Teflon

Für den mikroskopischen Nachweis der Adsorption von exprimiertem Hydrophobin an Teflon wird ein fluoreszenzmarkierter HA-Antikörper (Molecular Probes, Kat.-Nr. A-21287) verwendet.

Transformierte Wirtszellen, hergestellt nach einem der Beispiele 1 bis 4 werden kultiviert. Zellen und gegebenenfalls Überstand werden getrennt geerntet. Als Referenzprobe dienen Zellen, welche mit einem entsprechenden Vektor ohne Hydrophobingen transformiert und kultiviert wurden, bzw. entsprechende Kulturüberstände.

Die Zellen werden mechanisch aufgeschlossen (Schwingmühle). Teflonplättchen werden bei Raumtemperatur für 18 h im Zellaufschluss bzw. Überstand inkubiert, mit Wasser gespült (3 x 10 min). Anschließend erfolgt die Inkubation des behandelten Teflons in PBS mit fluoreszenzmarkiertem Antikörper. Dann wird erneut mit PBS (3 x

15 min) gespült und im N<sub>2</sub>-Strahl getrocknet. Schließlich erfolgt die fluoreszenzmikroskopische Auswertung.

- 5 Man beobachtet (Ergebnisse nicht gezeigt) keine Fluoreszenz auf Referenzprobe, dagegen spotförmige Fluoreszenz nach Inkubation in Zellhomogenat oder Kulturüberstand (bei Sezernierung des Hydrophobins durch die exprimierenden Zellen).



Patentansprüche

1. Expressionskonstrukt, umfassend die kodierende Nukleinsäuresequenz für ein von Hefezellen prozessierbares Shuttlepeptidkonstrukt der allgemeinen Formel
- 5 (Sig-SP),
- enthaltend in 5'-3'-Richtung die kodierenden Nukleinsäuresequenzen für
- a) ein Signalpeptid (Sig), prozessierbar verknüpft mit
- 10 b) wenigstens einem von den Hefezellen sezernierbaren Shuttlepeptid (SP).
2. Expressionskonstrukt nach Anspruch 1, wobei das Shuttlepeptidkonstrukt (Sig-SP) von einem von Hefen der Gattung Schizosaccharomyces, insbesondere von *S. pombe* prozessierten Polypeptid abgeleitet ist.
- 15 3. Expressionskonstrukt nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Shuttlepeptidkonstrukt (Sig-SP) von einem Pheromon-Präprotein aus einer Hefe abgeleitet ist, wobei das Pheromon (Pher) durch N- und C-terminale Prozessierung aus dem Präprotein ableitbar und sezernierbar ist.
- 20 4. Expressionskonstrukt nach Anspruch 3, wobei das Signalpolypeptid (Sig) das proteolytisch abspaltbare native Signalpolypeptid des Pheromon-Präproteins ist
- 25 5. Expressionskonstrukt nach Anspruch 4, wobei das C-terminal prozessierte Pheromon (Pher) eine C-terminale Proteaseschnittstelle umfasst.
6. Expressionskonstrukt nach einem der vorhergehenden Ansprüche, weiterhin enthaltend die kodierende Nukleinsäuresequenz für ein homologes oder heterologes Zielprotein (Targ), prozessierbar verknüpft mit dem C-Terminus des Shuttlepeptidkonstrukts (Sig-SP).
- 30 7. Expressionskonstrukt nach einem der vorhergehenden Ansprüche, umfassend die kodierende Nukleinsäuresequenz für ein von Hefezellen prozessierbares Fusionsprotein der allgemeinen Formel
- 35

Sig-L<sub>1</sub>-Pher-L<sub>2</sub>-Targ

40

worin

Sig, Pher und Targ wie oben definiert sind,  
L1 und L2 für prozessierbare Linker stehen und  
n und m unabhängig voneinander für 0 oder 1 stehen.

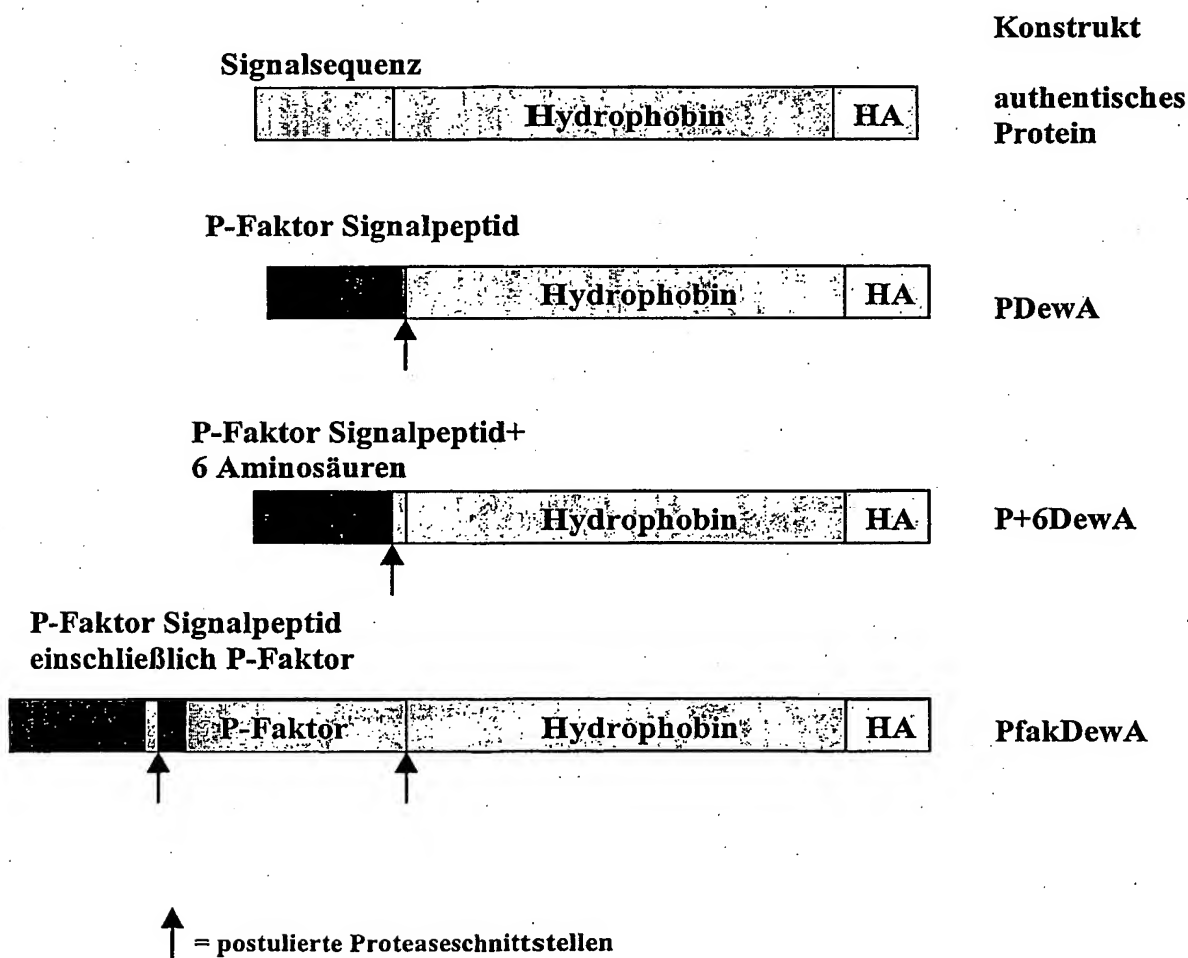
- 5        8.    Expressionskonstrukt nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die  
          kodierende Nukleinsäuresequenz für das Shuttlepeptidkonstrukt (Sig-SP) eine  
          für ein Signalpolypeptid kodierende Sequenz gemäß SEQ ID NO: 3 oder ein  
          funktionales Äquivalent davon, operativ verknüpft mit der für ein reifes Phe-  
10        romon-Protein (P-Faktor) kodierenden Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID  
          NO:5 oder ein funktionales Äquivalent davon umfasst.
9.    Expressionskonstrukt nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die  
          kodierende Nukleinsäuresequenz für das Shuttlepeptidkonstrukt eine Se-  
15        quenz gemäß SEQ ID NO:1 umfasst, am 3'-Ende gegebenenfalls verlängert  
          um die kodierende Sequenz für ein Zielprotein (Targ)
10.   Expressionskonstrukt nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das  
          Zielprotein ein Hydrophobin, insbesondere ein Hydrophobin der Klasse I, ist.
- 20       11.   Expressionskonstrukt nach Anspruch 10, wobei das Hydrophobin ausgewählt  
          ist unter SEQ ID NO: 14 (DewA), SEQ ID NO:19 (RdIA) SEQ ID NO:20  
          (RdIB) SEQ ID NO:21 (HYP1) und SEQ ID NO: 22 (HYP4) oder von einer  
          Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO:13 kodiert wird.
- 25       12.   Expressionsvektor, umfassend in operativer Verknüpfung mit wenigstens ei-  
          ner regulativen Nukleinsäuresequenz ein Expressionskonstrukt nach einem  
          der vorhergehenden Ansprüche.
- 30       13.   Rekombinanter Mikroorganismus, enthaltend, gegebenenfalls stabil in das  
          Wirtsgenom integriert, wenigstens einen Expressionsvektor nach Anspruch  
          12 oder ein Expressionskonstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 11.
14.   Mikroorganismus nach Anspruch 13, ausgewählt unter Hefen.
- 35       15.   Mikroorganismus nach Anspruch 14, ausgewählt unter Hefen der Gattung  
          Schizosaccharomyces, insbesondere *S. pombe*.
16.   Von Hefezellen prozessierbares Shuttlepeptidkonstrukt (Sig-SP), abgeleitet  
          von einem Pheromon-Präprotein aus einer Hefe, wobei das Pheromon durch

N- und C-terminale Prozessierung aus dem Präprotein ableitbar und sezernierbar ist..

- 5 17. Shuttlepeptidkonstrukt nach Anspruch 16, enthaltend ein Signalpolypeptid N-terminal prozessierbar verknüpft mit dem C-terminal prozessierten Pheromonpolypeptid.
- 10 18. Shuttlepeptidkonstrukt nach Anspruch 17, wobei das Signalpolypeptid das proteolytisch abspaltbare native Signalpolypeptid des Pheromon-Präproteins ist
19. Shuttlepeptidkonstrukt nach Anspruch 17, wobei das C-terminal prozessierte Pheromonpolypeptid die C-terminale Proteaseschnittstelle umfasst.
- 15 20. Shuttlepeptidkonstrukt nach einem der Ansprüche 16 bis 19, umfassend eine Aminosäuresequenz nach SEQ ID NO:2 oder ein funktionales Äquivalent davon.
- 20 21. Verfahren zur rekombinanten Herstellung eines Zielproteins, wobei man einen Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 13 bis 15 kultiviert, die das Zielprotein kodierende Nukleinsäuresequenz exprimiert und das in das Kulturmedium sezernierte Zielprotein isoliert.
- 25 22. Verfahren nach Anspruch 21, wobei das Zielprotein ein Hydrophobin gemäß der Definition in Anspruch 10 oder 11 ist.
23. Nukleinsäure, kodierend für ein Shuttlepeptidkonstrukt nach einem der Ansprüche 16 bis 20.
- 30 24. Nukleinsäure gemäß der Definition in einem der Ansprüche 1 bis 11.
25. Hydrophobin erhältlich nach einem Verfahren gemäß Anspruch 22.
- 35 26. Verwendung eines Hydrophobin nach Anspruch 25 zur Oberflächenbehandlung.
27. Verwendung nach Anspruch 26, wobei man die Oberfläche von Gegenständen, ausgewählt unter Glas, Fasern, Geweben, Leder, lackierten Gegenständen, Folien und Fassaden behandelt.
- 40

28. Verwendung eines Hydrophobins gemäß der Definition in Anspruch 10 oder 11 zur Oberflächenbehandlung von Fasern, Geweben und Leder.

Fig.1

Konstrukte zur Sekretion der Hydrophobine aus *S. pombe*

**Fig. 2****A) Genomische Sequenz des DewA-Gens:**

(Die Sequenzen der zwei Introns sind unterstrichen)

ATGCGCTTCA TCGTCTCTCT CCTCGCCTTC ACTGCCGCGG CCACCGCAAC CGCCCTCCCG  
 GCCTCTGCCG CAAAGAACGC GAAGCTGGCC ACCTCGGCGG CCTTCGCCAA GCAGGCTGAA  
 GGCACCACCT GCAATGTCGG CTCGATCGCT TGCTGCAACT CCCCCTGTA GACCAACAAC  
 GACAGTCTGT TGAGCGGTCT GCTCGGTGCT GGCTTCTCA ACGGGCTCTC GGGCAACACT  
 GGCAGCGCCT GCGCCAAGGC GAGCTTGATT GACCAGCTGG GTCTGCTCGG TACGTGATCC  
CCACTCAGTC GCTCCCGGAG AGGCTGAGGG AAGACGAGCG ACGGTCTAGA AATGGTGTGC  
TAATAGATGC ATGTGTGCAG CTCTCGTCGA CCACTGAG GAAGGCCCCG TCTGCAAGAA  
CATCGTCGCT TGCTGCCCTG AGGGAACCAC CAACGTACGT CTTTCAGATC TGCTACAAGT  
GAGGCGATCA AAACTAACAT ATTCCAGTGT GTTGCCGTCG ACAACGCTGG CGCCGGTACC  
 AAGGCTGAGT AA

**B) Sequenz des DewA-Proteins aus *Aspergillus nidulans*:**

MRFIVSLLAF TAAATATALP ASAAKNAKLA TSAAFKQAE GTTCNVGSIA CCNSPAETNN  
 DILLSGLLGA GLLNLSGNT GSACAKASLI DQLGLLALVD HTEEGPVCKN IVACCPEGTT  
 NCVAVDNAGA GTKAE

(ATGCGCTTCA TCGTCTCTCT CCTCGCCTTC ACTGCCGCGG CCACCGCAAC CGCCCTCCCG  
 GCCTCTGCCG CAAAGAACGC GAAGCTGGCC ACCTCGGCGG CCTTCGCCAA GCAGGCTGAA  
 GGCACCACCT GCAATGTCGG CTCGATCGCT TGCTGCAACT CCCCCTGTA GACCAACAAC  
 GACAGTCTGT TGAGCGGTCT GCTCGGTGCT GGCTTCTCA ACGGGCTCTC GGGCAACACT  
 GGCAGCGCCT GCGCCAAGGC GAGCTTGATT GACCAGCTGG GTCTGCTCGC TCTCGTCGAC  
 CCACTGAGG AAGGCCCCGT CTGCAAGAAC ATCGTCGCTT GCTGCCCTGA GGGAACCACC  
 AACTGTGTTG CCGTCGACAA CGCTGGCGCC GGTACCAAGG CTGAGTAA)

**C) Sequenz des HA-Tag:**

LVPRGSIEGR GGRIFYPYDV PDYAGYPYDV PDYAGSYPYD VPDYAAQCGR  
 (CTGGT TCCGCGTGGA TCCATCGAAG GTCGTGGCGG CCGCATCTTT TACCCATACG  
 ATGTTCTGA CTATGCGGGC TATCCCTATG ACGTCCCGGA CTATGCAGGA TCCTATCCAT  
 ATGACGTTCC AGATTACGCT GCTCAGTGCG GCCGCTAATA G)

Best Available Copy

**Fig.3****A) Sequenz des P-Faktor Präproteins:**

MKITAVIALL FSLAAASPIP VADPGVSVS KSYADFLRVY QSWNTFANPD RPNLKKREFE  
 AAPAKTYADF LRAYQSWNTF VNPDRPNLKK REFEAAPEKS YADFLRAYHS WNTFVNPD RP  
NLKKREFEAA PAKTYADFLR AYQSWNTFVN PDRPNLKKRT EEDEENEEED EEYRFLQFY  
 IMTVPENSTI TDVNITAKFE S  
 (ATGAAGATCA CCGCTGTCAT TGCCCTTTTA TTCTCACTTG CTGCTGCCTC ACCTATTCCA  
 GTTGCCGATC CTGGTGTGGT TTCAGTTAGC AAGTCATATG CTGATTTTCCT TCGTGTTTAC  
CAAAGTTGGA ACACTTTTGC TAATCCTGAT AGACCCAACT TGAAAAAGCG CGAATTTCGAA  
GCTGCTCCCG CAAAAACTTA TGCTGATTTT CTTCGTGCTT ATCAAAGTTG GAACACTTTT  
GTTAATCCTG ACAGACCCAA TTTGAAAAAG CGTGAGTTTG AAGCTGCCCC AGAGAAGAGT  
TATGCTGATT TCCTTCGTGC TTACCATAGT TGGAACACTT TTGTTAATCC TGACAGACCC  
AAGTTGAAAA AGCGCGAATT CGAAGCTGCT CCCGCAAAAA CTTATGCTGA TTTCCTTCGT  
GCTTACCAAA GTTGGAACAC TTTTGTTAAT CCTGACAGAC CCAACTTGAA AAAGCGCACT  
 GAAGAAGATG AAGAGAATGA GGAAGAGGAT GAAGAATACT ATCGCTTTCT TCAGTTTTAT  
 ATCATGACTG TCCAGAGAA TTCCACTATT ACAGATGTCA ATATTACTGC CAAATTTGAG  
 AGCTAA)

**B) Sequenz des abspaltbaren Signalpeptides und der sich daran anschließenden 6 Aminosäuren des P-Faktor Präproteins:**

MKITAVIALL FSLAAASPIP VADPGV  
 (ATGAAGATCA CCGCTGTCAT TGCCCTTTTA TTCTCACTTG CTGCTGCCTC ACCTATTCCA  
 GTTGCCGATC CTGGTGTG)

**C) Genutzte Sequenz zum "P-Shuttle":**

MKITAVIALL FSLAAASPIP VADPGVSVS KSYADFLRVY QSWNTFANPD RPNLKKR  
 (ATGAAGATCA CCGCTGTCAT TGCCCTTTTA TTCTCACTTG CTGCTGCCTC ACCTATTCCA  
 GTTGCCGATC CTGGTGTGGT TTCAGTTAGC AAGTCATATG CTGATTTTCCT TCGTGTTTAC  
CAAAGTTGGA ACACTTTTGC TAATCCTGAT AGACCCAACT TGAAAAAGCG C)

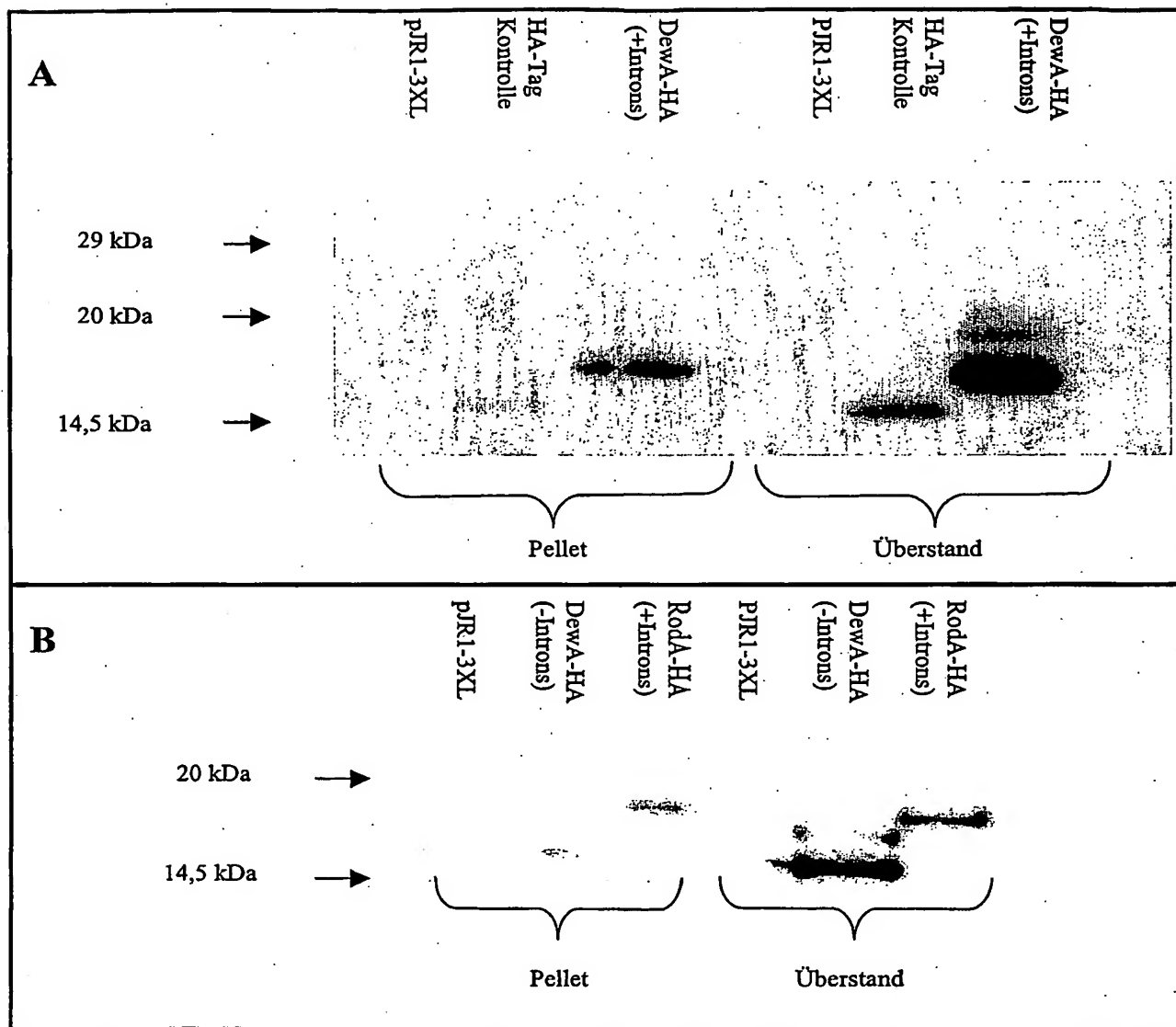
**Fig. 4**

**Fusionsprotein bestehend aus der "P-Shuttle"-Sequenz, dem maturen DewA und dem C-terminal fusionierten HA-Tag:**

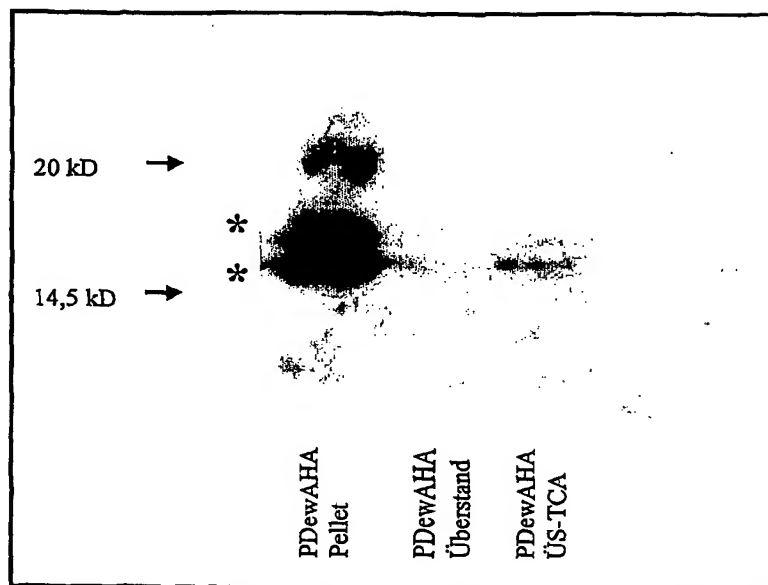
MKITAVIALL FSLAAASPIP VADPGVVSVS KSYADFLRVY QSWNTFANPD RPNLKKRLPA  
SAAKNAKLAT SAAFAKQAEQ TTCNVGSIAC CNSPAETNND SLLSGLLGAG LLNGLSGNTG  
SACAKASLID QLGLLALVDH TEEGPVCKNI VACCPEGTTN CVAVDNAGAG TKAELVPRGS  
IEGRGGRIFY PYDVPDYAGY PYDVPDYAGS YPYDVPDYAA QCGR  
(ATGAAGATCA CCGCTGTCAT TGCCCTTTTA TTCTCACTTG CTGCTGCCTC ACCTATTCCA  
GTTGCCGATC CTGGTGTGGT TTCAGTTAGC AAGTCATATG CTGATTTCCT TCGTGTTTAC  
CAAAGTTGGA ACACTTTTGC TAATCCTGAT AGACCCAACCT TGAAAAAGCG CCTCCCGGCC  
TCTGCCGCAA AGAACGCGAA GCTGGCCACC TCGGCGGCCT TCGCCAAGCA GGCTGAAGGC  
ACCACCTGCA ATGTCGGCTC GATCGCTTGC TGCAACTCCC CCGCTGAGAC CAACAACGAC  
AGTCTGTTGA GCGGTCTGCT CGGTGCTGGC CTTCTCAACG GGCTCTCGGG CAACACTGGC  
AGCGCCTGCG CCAAGGCGAG CTTGATTGAC CAGCTGGGTC TGCTCGCTCT CGTCGACCAC  
ACTGAGGAAG GCCCCGTCTG CAAGAACATC GTCGCTTGCT GCCCTGAGGG AACCACCAAC  
TGTGTTGCCG TCGACAACGC TGGCGCCGGT ACCAAGGCTG AGCTGGTTCC GCGTGGATCC  
ATCGAAGGTC GTGGCGGCCG CATCTTTTAC CCATACGATG TTCCTGACTA TGCGGGCTAT  
CCCTATGACG TCCCGGACTA TGCAGGATCC TATCCATATG ACGTTCCAGA TTACGCTGCT  
CAGTGCGGCC GCTAATAG)



Fig.5



**Fig.6**



**Fig.7**

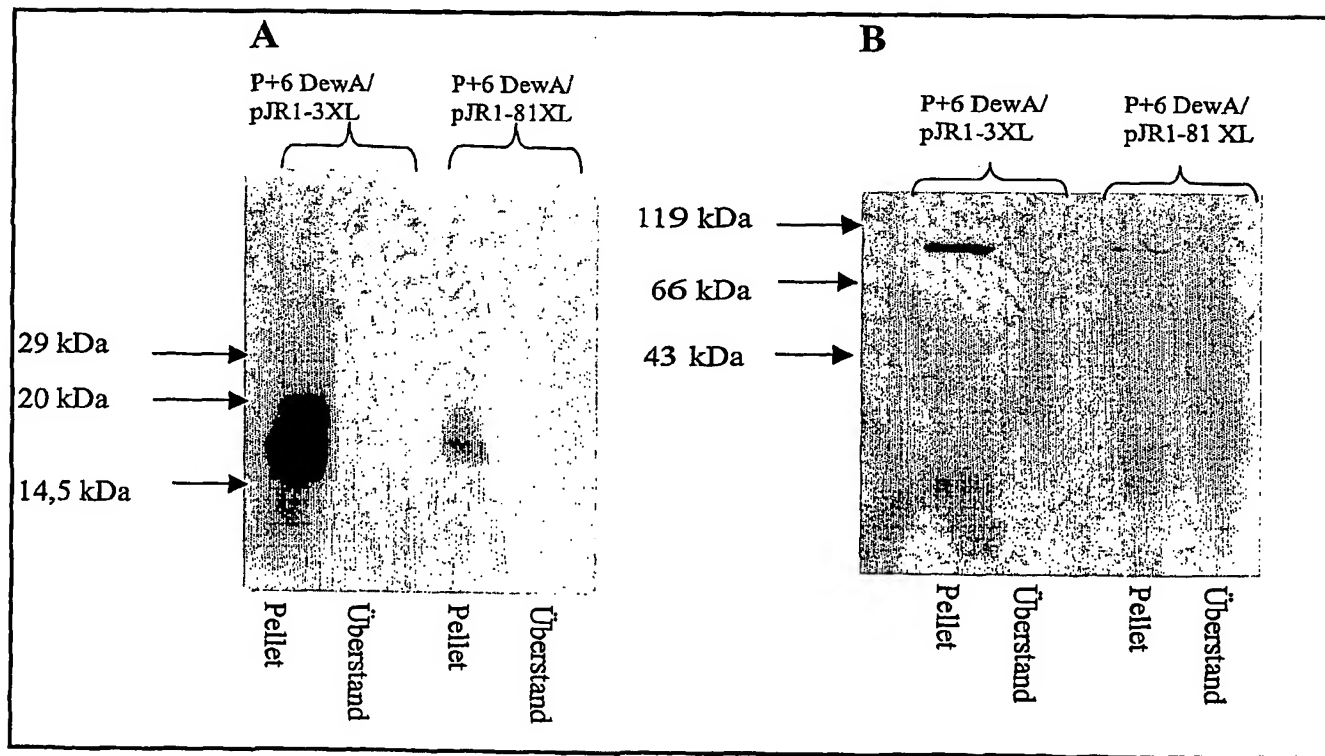
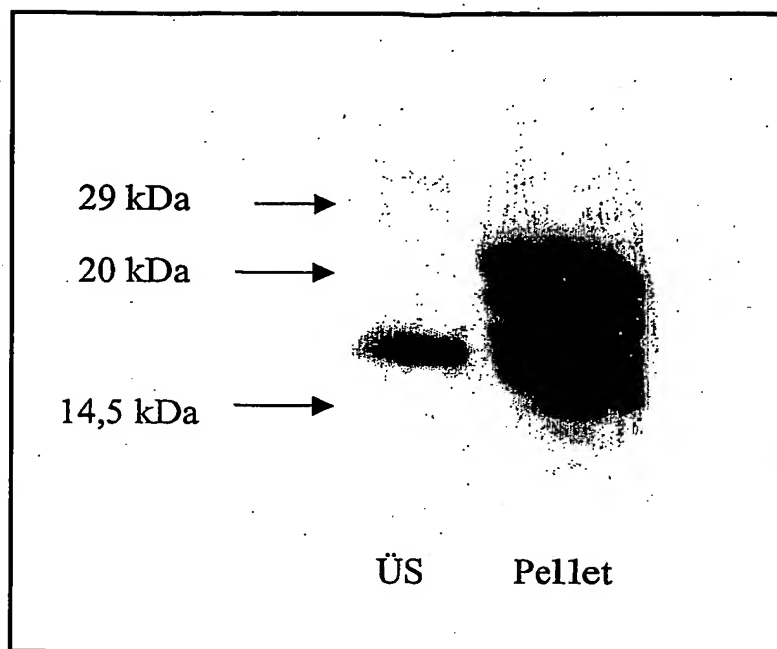


Fig.8



Best Available Copy

Fig. 9

**A) *mfm1*<sup>+</sup> Gen****Sequenz des *mfm1*-Präprotein**

MDSMANSVSSSSVVNAGNKPAETLNKTVKKNYTPKVPYMCVIA

**Sequenz des *mfm1*<sup>+</sup>-Gens**atggactcaa tggctaactc cgtttcttcc tctctgtcg tcaacgctgg caacaagcct  
gctgaaactc ttaacaagac cgtaagaat tatacccca aggttcctta catgtgtgc attgcataa***mfm1* matures M-Pheromon**

YTPKVPYMC

**DNA-Sequenz des maturen *mfm1* M-Pheromon**

tatacccca aggttcctta catgtgt

**B) *mfm2*<sup>+</sup>-Gen****Sequenz des *mfm2*-Präprotein**

MDSIATNTHSSSIVNAYNNPTDVVKTONIKKNYTPKVPYMCVIA

**Sequenz des *mfm2*<sup>+</sup>-Gens**atggactcca ttgcaactaa cactcattct tcatccattg tcaatgccta caacaacaat  
cctaccgatg ttgtaaaaac tcaaaacatt aaaaattata ctccaaaggt tccttatatg  
tgtgtaattg cttaa***mfm2* matures M-Pheromon**

YTPKVPYMC

**DNA-Sequenz des maturen *mfm2* M-Pheromon**

tata ctccaaaggt tccttatatg tgt

**C) *mfm3*<sup>+</sup>-Gen****Sequenz des *mfm3*-Präprotein**

MDSMANTVSSSVVNTGNKPSETLNKTVKKNYTPKVPYMCVIA

**Sequenz des *mfm3*<sup>+</sup>-Gens**atggactcaa tggctaacac tgtttcttcc tccgtcgta acactggcaa caagccttct  
gaaactctta acaagactgt taagaattat accccaagg ttccttacat gtgtgtcatt gcataa***mfm3* matures M-Pheromon**

YTPKVPYMC

**DNA-Sequenz des maturen *mfm3* M-Pheromon**

tat accccaagg ttccttacat gtgt

Best Available Copy

Fig. 10

**Genomische Sequenz des *RodA* Gens**

ATGAAGTTCT	CCATTGCTGC	CGCTGTCGTT	GCTTTCGCCG	CCTCCGTCGC	GGCCCTCCCT	CCTGCCCATG
ATTCCCAGTT	CGCTGGCAAT	GGTGTTGGCA	ACAAGGGCAA	CAGCAACGTC	AAGTTCCTTG	TCCCCGAAAA
CGTGACCGTC	AAGCAGGCCT	CCGACAAGTG	CGGTGACCAG	GCCCAGCTCT	CTTGCTGCAA	CAAGGCCACG
TACGCCGGTG	ACACCACAAC	CGTTGATGAG	GGTCTTCTGT	CTGGTGCCCT	CAGCGGCCTC	ATCGGCGCCG
GGTCTGGTGC	CGAAGGTCTT	GGTCTCTTCG	ATCAGTGCTC	CAAGCTTGAT	GTTGCTGGTC	AGTTCTTCGA
AAATCACTTT	CGTGATGCCC	CAATGCTAAC	AATTACCACT	CCTCATTGGC	ATCCAAGATC	TTGTCAACCA
GAAGTGCAAG	CAAAACATTG	CCTGCTGCCA	GAACTCCCCC	TCCAGCGCGG	TATGTTCCCT	TGTTTTACAG
CTTATTCACT	TAAACCGATT	AATCTAACAA	CGCTCACAGG	ATGGCAACCT	TATTGGTGTC	GGTCTCCCTT
GCGTTGCCCT	TGGCTCCATC	CTCTAA				

**DNA-Sequenz des offenen Leserahmens (ORF) des *RodA*-Gens**

ATGAAGTTCT	CCATTGCTGC	CGCTGTCGTT	GCTTTCGCCG	CCTCCGTCGC	GGCCCTCCCT	CCTGCCCATG
ATTCCCAGTT	CGCTGGCAAT	GGTGTTGGCA	ACAAGGGCAA	CAGCAACGTC	AAGTTCCTTG	TCCCCGAAAA
CGTGACCGTC	AAGCAGGCCT	CCGACAAGTG	CGGTGACCAG	GCCCAGCTCT	CTTGCTGCAA	CAAGGCCACG
TACGCCGGTG	ACACCACAAC	CGTTGATGAG	GGTCTTCTGT	CTGGTGCCCT	CAGCGGCCTC	ATCGGCGCCG
GGTCTGGTGC	CGAAGGTCTT	GGTCTCTTCG	ATCAGTGCTC	CAAGCTTGAT	GTTGCTGTCC	TCATTGGCAT
CCAAGATCTT	GTCAACCAGA	AGTGCAAGCA	AAACATTGCC	TGCTGCCAGA	ACTCCCCCTC	CAGCGCGGAT
GGCAACCTTA	TTGGTGTCGG	TCTCCCTTGC	GTTGCCCTTG	GCTCCATCCT	CTAA	

**Sequenz des RodA-Proteins**

MKFSIAAAVV	AFAASVAALP	PAHDSQFAGN	GVGNKGNNSNV	KFPVPENVTV	KQASDKCGDQ	AQLSCCNKAT
YAGDTTIVDE	GLLSGALSGL	IGAGSGAEGE	GLFDQCSKLD	VAVLIGIQDL	VNQKCKQNI	CCQNSPSSAD
GNLIGVGLPC	VALGSIL					

## SEQUENCE LISTING

5 <110> BASF Aktiengesellschaft

10 <120> Sekretion von Proteinen aus Hefen

<130> M/44234

15 <160> 56

20 <170> PatentIn version 3.1

25 <210> 1

<211> 171

<212> DNA

30 <213> Schizosaccharomyces pombe

35 <220>

<221> CDS

<222> (1) .. (171)

40 <223>

45 <400> 1

atg aag atc acc gct gtc att gcc ctt tta ttc tca ctt gct gct gcc	48
Met Lys Ile Thr Ala Val Ile Ala Leu Leu Phe Ser Leu Ala Ala Ala	
1 5 10 15	

50 tca cct att cca gtt gcc gat cct ggt gtg gtt tca gtt agc aag tca 96

Ser Pro Ile Pro Val Ala Asp Pro Gly Val Val Ser Val Ser Lys Ser	
20 25 30	

55 tat gct gat ttc ctt cgt gtt tac caa agt tgg aac act ttt gct aat 144

Tyr Ala Asp Phe Leu Arg Val Tyr Gln Ser Trp Asn Thr Phe Ala Asn	
35 40 45	

cct gat aga ccc aac ttg aaa aag cgc  
Pro Asp Arg Pro Asn Leu Lys Lys Arg  
50 55

5

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 57

10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Schizosaccharomyces pombe

15

&lt;400&gt; 2

Met Lys Ile Thr Ala Val Ile Ala Leu Leu Phe Ser Leu Ala Ala Ala  
1 5 10 15

20

Ser Pro Ile Pro Val Ala Asp Pro Gly Val Val Ser Val Ser Lys Ser  
20 25 30

25

Tyr Ala Asp Phe Leu Arg Val Tyr Gln Ser Trp Asn Thr Phe Ala Asn  
35 40 45

30

Pro Asp Arg Pro Asn Leu Lys Lys Arg  
50 55

35

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 60

&lt;212&gt; DNA

40

&lt;213&gt; Schizosaccharomyces pombe

45

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1) .. (60)

50

&lt;223&gt;

55

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; sig\_peptide

&lt;222&gt; (1) .. (60)

&lt;223&gt;

5 <400> 3  
 atg aag atc acc gct gtc att gcc ctt tta ttc tca ctt gct gct gcc 48  
 Met Lys Ile Thr Ala Val Ile Ala Leu Leu Phe Ser Leu Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

10 tca cct att cca 60  
 Ser Pro Ile Pro  
 20

15 <210> 4  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 20 <213> Schizosaccharomyces pombe

25 <400> 4  
 Met Lys Ile Thr Ala Val Ile Ala Leu Leu Phe Ser Leu Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

30 Ser Pro Ile Pro  
 20

35 <210> 5  
 <211> 81  
 <212> DNA  
 40 <213> Schizosaccharomyces pombe

45 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(81)  
 50 <223>

55 <400> 5  
 aag tca tat gct gat ttc ctt cgt gtt tac caa agt tgg aac act ttt 48  
 Lys Ser Tyr Ala Asp Phe Leu Arg Val Tyr Gln Ser Trp Asn Thr Phe  
 1 5 10 15



gct aat cct gat aga ccc aac ttg aaa aag cgc 81  
 Ala Asn Pro Asp Arg Pro Asn Leu Lys Lys Arg  
                   20                  25

5  
     <210> 6  
     <211> 27

10  
     <212> PRT  
     <213> Schizosaccharomyces pombe

15  
     <400> 6

Lys Ser Tyr Ala Asp Phe Leu Arg Val Tyr Gln Ser Trp Asn Thr Phe  
 1                  5                  10                  15

20  
     Ala Asn Pro Asp Arg Pro Asn Leu Lys Lys Arg  
                   20                  25

25  
     <210> 7  
     <211> 78

30  
     <212> DNA  
     <213> Schizosaccharomyces pombe

35  
     <220>  
     <221> CDS

40  
     <222> (1)..(78)  
     <223>

45  
     <220>  
     <221> sig\_peptide

50  
     <222> (1)..(60)  
     <223>

55  
     <400> 7  
     atg aag atc acc gct gtc att gcc ctt tta ttc tca ctt gct gct gcc 48  
     Met Lys Ile Thr Ala Val Ile Ala Leu Leu Phe Ser Leu Ala Ala Ala  
     1                  5                  10                  15

tca cct att cca gtt gcc gat cct ggt gtg  
 Ser Pro Ile Pro Val Ala Asp Pro Gly Val 78  
 20 25  
 5  
 <210> 8  
 <211> 26  
 10  
 <212> PRT  
 <213> Schizosaccharomyces pombe  
 15  
 <400> 8  
 Met Lys Ile Thr Ala Val Ile Ala Leu Leu Phe Ser Leu Ala Ala Ala  
 20 1 5 10 15  
 Ser Pro Ile Pro Val Ala Asp Pro Gly Val  
 25 20 25  
 <210> 9  
 <211> 606  
 30  
 <212> DNA  
 <213> Schizosaccharomyces pombe  
 35  
 <220>  
 <221> CDS  
 40  
 <222> (1) .. (606)  
 <223>  
 45  
 <400> 9  
 atg aag atc acc gct gtc att gcc ctt tta ttc tca ctt gct gct gcc 48  
 Met Lys Ile Thr Ala Val Ile Ala Leu Leu Phe Ser Leu Ala Ala Ala  
 50 1 5 10 15  
 tca cct att cca gtt gcc gat cct ggt gtg gtt tca gtt agc aag tca 96  
 Ser Pro Ile Pro Val Ala Asp Pro Gly Val Val Ser Val Ser Lys Ser  
 55 20 25 30  
 tat gct gat ttc ctt cgt gtt tac caa agt tgg aac act ttt gct aat 144  
 Tyr Ala Asp Phe Leu Arg Val Tyr Gln Ser Trp Asn Thr Phe Ala Asn  
 35 40 45

	cct gat aga ccc aac ttg aaa aag cgc gaa ttc gaa gct gct ccc gca	192
	Pro Asp Arg Pro Asn Leu Lys Lys Arg Glu Phe Glu Ala Ala Pro Ala	
	50 55 60	
5	aaa act tat gct gat ttc ctt cgt gct tat caa agt tgg aac act ttt	240
	Lys Thr Tyr Ala Asp Phe Leu Arg Ala Tyr Gln Ser Trp Asn Thr Phe	
	65 70 75 80	
10	gtt aat cct gac aga ccc aat ttg aaa aag cgt gag ttt gaa gct gcc	288
	Val Asn Pro Asp Arg Pro Asn Leu Lys Lys Arg Glu Phe Glu Ala Ala	
	85 90 95	
15	cca gag aag agt tat gct gat ttc ctt cgt gct tac cat agt tgg aac	336
	Pro Glu Lys Ser Tyr Ala Asp Phe Leu Arg Ala Tyr His Ser Trp Asn	
	100 105 110	
	act ttt gtt aat cct gac aga ccc aac ttg aaa aag cgc gaa ttc gaa	384
	Thr Phe Val Asn Pro Asp Arg Pro Asn Leu Lys Lys Arg Glu Phe Glu	
	115 120 125	
20	gct gct ccc gca aaa act tat gct gat ttc ctt cgt gct tac caa agt	432
	Ala Ala Pro Ala Lys Thr Tyr Ala Asp Phe Leu Arg Ala Tyr Gln Ser	
	130 135 140	
25	tgg aac act ttt gtt aat cct gac aga ccc aac ttg aaa aag cgc act	480
	Trp Asn Thr Phe Val Asn Pro Asp Arg Pro Asn Leu Lys Lys Arg Thr	
	145 150 155 160	
30	gaa gaa gat gaa gag aat gag gaa gag gat gaa gaa tac tat cgc ttt	528
	Glu Glu Asp Glu Glu Asn Glu Glu Glu Asp Glu Glu Tyr Tyr Arg Phe	
	165 170 175	
35	ctt cag ttt tat atc atg act gtc cca gag aat tcc act att aca gat	576
	Leu Gln Phe Tyr Ile Met Thr Val Pro Glu Asn Ser Thr Ile Thr Asp	
	180 185 190	
	gtc aat att act gcc aaa ttt gag agc taa	606
	Val Asn Ile Thr Ala Lys Phe Glu Ser	
	195 200	
40	<210> 10	
	<211> 201	
45	<212> PRT	
	<213> Schizosaccharomyces pombe	
50	<400> 10	
	Met Lys Ile Thr Ala Val Ile Ala Leu Leu Phe Ser Leu Ala Ala Ala	
55	1 5 10 15	
	Ser Pro Ile Pro Val Ala Asp Pro Gly Val Val Ser Val Ser Lys Ser	
	20 25 30	

Tyr Ala Asp Phe Leu Arg Val Tyr Gln Ser Trp Asn Thr Phe Ala Asn  
 35 40 45  
 5

Pro Asp Arg Pro Asn Leu Lys Lys Arg Glu Phe Glu Ala Ala Pro Ala  
 50 55 60  
 10

Lys Thr Tyr Ala Asp Phe Leu Arg Ala Tyr Gln Ser Trp Asn Thr Phe  
 65 70 75 80  
 15

Val Asn Pro Asp Arg Pro Asn Leu Lys Lys Arg Glu Phe Glu Ala Ala  
 85 90 95  
 20

Pro Glu Lys Ser Tyr Ala Asp Phe Leu Arg Ala Tyr His Ser Trp Asn  
 100 105 110  
 25

Thr Phe Val Asn Pro Asp Arg Pro Asn Leu Lys Lys Arg Glu Phe Glu  
 115 120 125  
 30

Ala Ala Pro Ala Lys Thr Tyr Ala Asp Phe Leu Arg Ala Tyr Gln Ser  
 130 135 140  
 35

Trp Asn Thr Phe Val Asn Pro Asp Arg Pro Asn Leu Lys Lys Arg Thr  
 145 150 155 160  
 40

Glu Glu Asp Glu Glu Asn Glu Glu Glu Asp Glu Glu Tyr Tyr Arg Phe  
 165 170 175  
 45

Leu Gln Phe Tyr Ile Met Thr Val Pro Glu Asn Ser Thr Ile Thr Asp  
 180 185 190  
 50

Val Asn Ile Thr Ala Lys Phe Glu Ser  
 195 200  
 55

<210> 11  
 <211> 156  
 <212> DNA  
 <213> Unknown  
 <220>  
 <223> to be completed

<220>  
 <221> CDS  
 5 <222> (1)..(156)  
 <223>  
 10  
 <400> 11  
 ctg gtt ccg cgt gga tcc atc gaa ggt cgt ggc ggc cgc atc ttt tac 48  
 Leu Val Pro Arg Gly Ser Ile Glu Gly Arg Gly Gly Arg Ile Phe Tyr  
 15 1 5 10 15  
 cca tac gat gtt cct gac tat gcg ggc tat ccc tat gac gtc ccg gac 96  
 Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp  
 20 20 25 30  
 tat gca gga tcc tat cca tat gac gtt cca gat tac gct gct cag tgc 144  
 Tyr Ala Gly Ser Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ala Gln Cys  
 35 40 45  
 25 ggc cgc taa tag 156  
 Gly Arg  
 50  
 30 <210> 12  
 <211> 50  
 <212> PRT  
 35 <213> Unknown  
 40 <220>  
 <223> to be completed  
 <400> 12  
 45 Leu Val Pro Arg Gly Ser Ile Glu Gly Arg Gly Gly Arg Ile Phe Tyr  
 1 5 10 15  
 50 Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp  
 20 25 30  
 55 Tyr Ala Gly Ser Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ala Gln Cys  
 35 40 45  
 Gly Arg  
 50

<210> 13  
 5 <211> 354  
 <212> DNA  
 10 <213> *Aspergillus nidulans*  
 <220>  
 15 <221> CDS  
 <222> (1) .. (354)  
 20 <223>  
 <400> 13  
 25 ctc ccg gcc tct gcc gca aag aac gcg aag ctg gcc acc tcg gcg gcc 48  
 Leu Pro Ala Ser Ala Ala Lys Asn Ala Lys Leu Ala Thr Ser Ala Ala  
 1 5 10 15  
 ttc gcc aag cag gct gaa ggc acc acc tgc aat gtc ggc tcg atc gct 96  
 Phe Ala Lys Gln Ala Glu Gly Thr Thr Cys Asn Val Gly Ser Ile Ala  
 30 20 25 30  
 tgc tgc aac tcc ccc gct gag acc aac aac gac agt ctg ttg agc ggt 144  
 Cys Cys Asn Ser Pro Ala Glu Thr Asn Asn Asp Ser Leu Leu Ser Gly  
 35 35 40 45  
 ctg ctc ggt gct ggc ctt ctc aac ggg ctc tcg ggc aac act ggc agc 192  
 Leu Leu Gly Ala Gly Leu Leu Asn Gly Leu Ser Gly Asn Thr Gly Ser  
 50 55 60  
 40 gcc tgc gcc aag gcg agc ttg att gac cag ctg ggt ctg ctc gct ctc 240  
 Ala Cys Ala Lys Ala Ser Leu Ile Asp Gln Leu Gly Leu Leu Ala Leu  
 65 70 75 80  
 gtc gac cac act gag gaa ggc ccc gtc tgc aag aac atc gtc gct tgc 288  
 45 Val Asp His Thr Glu Glu Gly Pro Val Cys Lys Asn Ile Val Ala Cys  
 85 90 95  
 tgc cct gag gga acc acc aac tgt gtt gcc gtc gac aac gct ggc gcc 336  
 50 Cys Pro Glu Gly Thr Thr Asn Cys Val Ala Val Asp Asn Ala Gly Ala  
 100 105 110  
 ggt acc aag gct gag taa 354  
 Gly Thr Lys Ala Glu  
 115  
 55  
 <210> 14

<211> 117  
<212> PRT  
5 <213> Aspergillus nidulans

<400> 14  
10 Leu Pro Ala Ser Ala Ala Lys Asn Ala Lys Leu Ala Thr Ser Ala Ala  
1 5 10 15  
15 Phe Ala Lys Gln Ala Glu Gly Thr Thr Cys Asn Val Gly Ser Ile Ala  
20 25 30  
20 Cys Cys Asn Ser Pro Ala Glu Thr Asn Asn Asp Ser Leu Leu Ser Gly  
35 40 45  
25 Leu Leu Gly Ala Gly Leu Leu Asn Gly Leu Ser Gly Asn Thr Gly Ser  
50 55 60  
Ala Cys Ala Lys Ala Ser Leu Ile Asp Gln Leu Gly Leu Leu Ala Leu  
65 70 75 80  
30 Val Asp His Thr Glu Glu Gly Pro Val Cys Lys Asn Ile Val Ala Cys  
85 90 95  
35 Cys Pro Glu Gly Thr Thr Asn Cys Val Ala Val Asp Asn Ala Gly Ala  
100 105 110  
40 Gly Thr Lys Ala Glu  
115

<210> 15  
45 <211> 408  
<212> DNA  
<213> Aspergillus nidulans  
50

<220>  
55 <221> CDS  
<222> (1)..(408)  
<223>

<400> 15  
 5 atg cgc ttc atc gtc tct ctc ctc gcc ttc act gcc gcg gcc acc gca 48  
 Met Arg Phe Ile Val Ser Leu Leu Ala Phe Thr Ala Ala Ala Thr Ala  
 1 5 10 15  
 acc gcc ctc ccg gcc tct gcc gca aag aac gcg aag ctg gcc acc tcg 96  
 10 Thr Ala Leu Pro Ala Ser Ala Ala Lys Asn Ala Lys Leu Ala Thr Ser  
 20 25 30  
 gcg gcc ttc gcc aag cag gct gaa ggc acc acc tgc aat gtc ggc tcg 144  
 15 Ala Ala Phe Ala Lys Gln Ala Glu Gly Thr Thr Cys Asn Val Gly Ser  
 35 40 45  
 atc gct tgc tgc aac tcc ccc gct gag acc aac aac gac agt ctg ttg 192  
 Ile Ala Cys Cys Asn Ser Pro Ala Glu Thr Asn Asn Asp Ser Leu Leu  
 50 55 60  
 20 agc ggt ctg ctc ggt gct ggc ctt ctc aac ggg ctc tcg ggc aac act 240  
 Ser Gly Leu Leu Gly Ala Gly Leu Leu Asn Gly Leu Ser Gly Asn Thr  
 65 70 75 80  
 25 ggc agc gcc tgc gcc aag gcg agc ttg att gac cag ctg ggt ctg ctc 288  
 Gly Ser Ala Cys Ala Lys Ala Ser Leu Ile Asp Gln Leu Gly Leu Leu  
 85 90 95  
 30 gct ctc gtc gac cac act gag gaa ggc ccc gtc tgc aag aac atc gtc 336  
 Ala Leu Val Asp His Thr Glu Glu Gly Pro Val Cys Lys Asn Ile Val  
 100 105 110  
 gct tgc tgc cct gag gga acc acc aac tgt gtt gcc gtc gac aac gct 384  
 35 Ala Cys Cys Pro Glu Gly Thr Thr Asn Cys Val Ala Val Asp Asn Ala  
 115 120 125  
 ggc gcc ggt acc aag gct gag taa 408  
 Gly Ala Gly Thr Lys Ala Glu  
 130 135  
 40  
 <210> 16  
 <211> 135  
 45 <212> PRT  
 <213> Aspergillus nidulans  
 50  
 <400> 16  
 55 Met Arg Phe Ile Val Ser Leu Leu Ala Phe Thr Ala Ala Ala Thr Ala  
 1 5 10 15  
 Thr Ala Leu Pro Ala Ser Ala Ala Lys Asn Ala Lys Leu Ala Thr Ser  
 20 25 30



12/34

5	Ala	Ala	Phe	Ala	Lys	Gln	Ala	Glu	Gly	Thr	Thr	Cys	Asn	Val	Gly	Ser	
								40						45			
	Ile	Ala	Cys	Cys	Asn	Ser	Pro	Ala	Glu	Thr	Asn	Asn	Asp	Ser	Leu	Leu	
		50					55					60					
10	Ser	Gly	Leu	Leu	Gly	Ala	Gly	Leu	Leu	Asn	Gly	Leu	Ser	Gly	Asn	Thr	
	65					70					75				80		
15	Gly	Ser	Ala	Cys	Ala	Lys	Ala	Ser	Leu	Ile	Asp	Gln	Leu	Gly	Leu	Leu	
					85					90					95		
20	Ala	Leu	Val	Asp	His	Thr	Glu	Glu	Gly	Pro	Val	Cys	Lys	Asn	Ile	Val	
				100					105					110			
25	Ala	Cys	Cys	Pro	Glu	Gly	Thr	Thr	Asn	Cys	Val	Ala	Val	Asp	Asn	Ala	
			115					120					125				
30	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Ala	Glu										
		130					135										
	<210>	17															
	<211>	678															
35	<212>	DNA															
	<213>	Artificial Sequence															
40	<220>																
	<223>	Fusionsprotein															
45	<220>																
	<221>	CDS															
	<222>	(1)..(678)															
50	<223>																
55	<400>	17															
	atg	aag	atc	acc	gct	gtc	att	gcc	ctt	tta	ttc	tca	ctt	gct	gct	gcc	48
	Met	Lys	Ile	Thr	Ala	Val	Ile	Ala	Leu	Leu	Phe	Ser	Leu	Ala	Ala	Ala	
	1				5				10					15			

	tca cct att cca gtt gcc gat cct ggt gtg gtt tca gtt agc aag tca	96
	Ser Pro Ile Pro Val Ala Asp Pro Gly Val Val Ser Val Ser Lys Ser	
	20 25 30	
5	tat gct gat ttc ctt cgt gtt tac caa agt tgg aac act ttt gct aat	144
	Tyr Ala Asp Phe Leu Arg Val Tyr Gln Ser Trp Asn Thr Phe Ala Asn	
	35 40 45	
10	cct gat aga ccc aac ttg aaa aag cgc ctc ccg gcc tct gcc gca aag	192
	Pro Asp Arg Pro Asn Leu Lys Lys Arg Leu Pro Ala Ser Ala Ala Lys	
	50 55 60	
15	aac gcg aag ctg gcc acc tcg gcg gcc ttc gcc aag cag gct gaa ggc	240
	Asn Ala Lys Leu Ala Thr Ser Ala Ala Phe Ala Lys Gln Ala Glu Gly	
	65 70 75 80	
20	acc acc tgc aat gtc ggc tcg atc gct tgc tgc aac tcc ccc gct gag	288
	Thr Thr Cys Asn Val Gly Ser Ile Ala Cys Cys Asn Ser Pro Ala Glu	
	85 90 95	
	acc aac aac gac agt ctg ttg agc ggt ctg ctc ggt gct ggc ctt ctc	336
	Thr Asn Asn Asp Ser Leu Leu Ser Gly Leu Leu Gly Ala Gly Leu Leu	
	100 105 110	
25	aac ggg ctc tcg ggc aac act ggc agc gcc tgc gcc aag gcg agc ttg	384
	Asn Gly Leu Ser Gly Asn Thr Gly Ser Ala Cys Ala Lys Ala Ser Leu	
	115 120 125	
30	att gac cag ctg ggt ctg ctc gct ctc gtc gac cac act gag gaa ggc	432
	Ile Asp Gln Leu Gly Leu Leu Ala Leu Val Asp His Thr Glu Glu Gly	
	130 135 140	
35	ccc gtc tgc aag aac atc gtc gct tgc tgc cct gag gga acc acc aac	480
	Pro Val Cys Lys Asn Ile Val Ala Cys Cys Pro Glu Gly Thr Thr Asn	
	145 150 155 160	
40	tgt gtt gcc gtc gac aac gct ggc gcc ggt acc aag gct gag ctg gtt	528
	Cys Val Ala Val Asp Asn Ala Gly Ala Gly Thr Lys Ala Glu Leu Val	
	165 170 175	
	ccg cgt gga tcc atc gaa ggt cgt ggc ggc cgc atc ttt tac cca tac	576
	Pro Arg Gly Ser Ile Glu Gly Arg Gly Gly Arg Ile Phe Tyr Pro Tyr	
	180 185 190	
45	gat gtt cct gac tat gcg ggc tat ccc tat gac gtc ccg gac tat gca	624
	Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala	
	195 200 205	
50	gga tcc tat cca tat gac gtt cca gat tac gct gct cag tgc ggc cgc	672
	Gly Ser Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ala Gln Cys Gly Arg	
	210 215 220	
55	taa tag	678
	<210> 18	
	<211> 224	

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

5

&lt;220&gt;

10

&lt;223&gt; Fusionsprotein

&lt;400&gt; 18

15

Met Lys Ile Thr Ala Val Ile Ala Leu Leu Phe Ser Leu Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

20

Ser Pro Ile Pro Val Ala Asp Pro Gly Val Val Ser Val Ser Lys Ser  
 20 25 30

Tyr Ala Asp Phe Leu Arg Val Tyr Gln Ser Trp Asn Thr Phe Ala Asn  
 35 40 45

25

Pro Asp Arg Pro Asn Leu Lys Lys Arg Leu Pro Ala Ser Ala Ala Lys  
 50 55 60

30

Asn Ala Lys Leu Ala Thr Ser Ala Ala Phe Ala Lys Gln Ala Glu Gly  
 65 70 75 80

35

Thr Thr Cys Asn Val Gly Ser Ile Ala Cys Cys Asn Ser Pro Ala Glu  
 85 90 95

40

Thr Asn Asn Asp Ser Leu Leu Ser Gly Leu Leu Gly Ala Gly Leu Leu  
 100 105 110

Asn Gly Leu Ser Gly Asn Thr Gly Ser Ala Cys Ala Lys Ala Ser Leu  
 115 120 125

45

Ile Asp Gln Leu Gly Leu Leu Ala Leu Val Asp His Thr Glu Glu Gly  
 130 135 140

50

Pro Val Cys Lys Asn Ile Val Ala Cys Cys Pro Glu Gly Thr Thr Asn  
 145 150 155 160

55

Cys Val Ala Val Asp Asn Ala Gly Ala Gly Thr Lys Ala Glu Leu Val  
 165 170 175

Pro Arg Gly Ser Ile Glu Gly Arg Gly Gly Arg Ile Phe Tyr Pro Tyr  
 180 185 190

Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala  
 195 200 205  
 5  
 Gly Ser Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ala Gln Cys Gly Arg  
 210 215 220  
 10 <210> 19  
 <211> 131  
 <212> PRT  
 15 <213> Streptomyces coelicolor  
 20 <400> 19  
 Met Leu Lys Lys Ala Met Val Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Val Ile  
 1 5 10 15  
 25 Gly Met Ser Ala Ala Ala Ala Pro Gln Ala Leu Ala Ile Gly Asp Asp  
 20 25 30  
 30 Asn Gly Pro Ala Val Ala Asn Gly Asn Gly Ala Glu Ser Ala Phe Gly  
 35 40 45  
 35 Asn Ser Ala Thr Lys Gly Asp Met Ser Pro Gln Leu Ser Leu Val Glu  
 50 55 60  
 40 Gly Thr Leu Asn Lys Pro Cys Leu Gly Val Glu Asp Val Asn Val Ala  
 65 70 75 80  
 Val Ile Asn Leu Val Pro Ile Gln Asp Ile Asn Val Leu Ala Asp Asp  
 85 90 95  
 45 Leu Asn Gln Gln Cys Ala Asp Asn Ser Thr Gln Ala Lys Arg Asp Gly  
 100 105 110  
 50 Ala Leu Ser His Val Leu Glu Asp Leu Ser Val Leu Ser Ala Asn Gly  
 115 120 125  
 55 Glu Gly Arg  
 130  
 <210> 20

<211> 133

<212> PRT

5 <213> Streptomyces coelicolor

<400> 20

10

Met Ile Lys Lys Val Val Ala Tyr Ala Ala Ile Ala Ala Ser Val Met  
1 5 10 15

15

Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Pro Gln Ala Met Ala Ile Gly Asp Asp  
20 25 30

20

Ser Gly Pro Val Ser Ala Asn Gly Asn Gly Ala Ser Gln Tyr Phe Gly  
35 40 45

25

Asn Ser Met Thr Thr Gly Asn Met Ser Pro Gln Met Ala Leu Ile Gln  
50 55 60

30

Gly Ser Phe Asn Lys Pro Cys Ile Ala Val Ser Asp Ile Pro Val Ser  
65 70 75 80

Val Ile Gly Leu Val Pro Ile Gln Asp Leu Asn Val Leu Gly Asp Asp  
85 90 95

35

Met Asn Gln Gln Cys Ala Glu Asn Ser Thr Gln Ala Lys Arg Asp Gly  
100 105 110

40

Ala Leu Ala His Leu Leu Glu Asp Val Ser Ile Leu Ser Ser Asn Gly  
115 120 125

Glu Gly Gly Lys Gly  
130

45

<210> 21

50

<211> 112

<212> PRT

<213> Agaricus bisporus

55

<400> 21

Met Ile Ser Arg Val Leu Val Ala Ala Leu Val Ala Leu Pro Ala Leu



Ile Thr Ala Ile Gly Ile Gly Ser Gly Ser Gln Cys Ser Gly Gln Thr  
85 90 95

5 Val Cys Cys Gln Asn Asn Asn Phe Asn Gly Val Val Ala Ile Gly Cys  
100 105 110

10 Thr Pro Ile Asn Ala Asn Val  
115

<210> 23

15 <211> 32

<212> DNA

20 <213> Artificial Sequence

<220>

25 <223> PCR primer

<400> 23

cagctggggtc tgctcgctct cgtcgaccac ac

32

30 <210> 24

<211> 32

35 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

40 <220>

<223> PCR primer

45 <400> 24

gtgtgggtcga cgagagcgag cagacccagc tg

32

50 <210> 25

<211> 30

<212> DNA

55 <213> Artificial Sequence

<220>  
<223> PCR primer  
5 <400> 25  
gaggggaacca ccaactgtgt tgccgtcgac 30  
  
10 <210> 26  
<211> 30  
<212> DNA  
15 <213> Artificial Sequence  
  
20 <220>  
<223> PCR primer  
<400> 26  
25 gtcgacggca acacagttgg tggttccctc 30  
  
<210> 27  
<211> 34  
30 <212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
35  
  
<220>  
<223> PCR primer  
40 <400> 27  
taataactcg agatgcgctt catcgtctct ctcc 34  
  
45 <210> 28  
<211> 33  
<212> DNA  
50 <213> Artificial Sequence  
  
55 <220>  
<223> PCR primer  
<400> 28



taataaggat ccttactcag ccttggtacc ggc 33

5 <210> 29  
<211> 30  
<212> DNA  
10 <213> Artificial Sequence

15 <220>  
<223> PCR primer  
<400> 29  
20 ggtaccaagg ctgagctggg tccgcgtgga 30

<210> 30  
<211> 30  
25 <212> DNA  
<213> Artificial Sequence

30 <220>  
<223> PCR primer  
35 <400> 30  
tccacgcgga accagctcag ccttggtacc 30

40 <210> 31  
<211> 36  
<212> DNA  
45 <213> Artificial Sequence

50 <220>  
<223> PCR primer  
<400> 31  
55 attattccat ggctattagc ggccgcactg agcagc 36

<210> 32

<211> 30  
<212> DNA  
5 <213> Artificial Sequence

<220>  
10 <223> PCR primer  
<400> 32  
15 gcctcaccta ttccactccc ggctctgcc 30

<210> 33  
<211> 30  
20 <212> DNA  
<213> Artificial Sequence

25 <220>  
<223> PCR primer  
30 <400> 33  
ggcagaggcc gggagtggaa taggtgagcc 30

35 <210> 34  
<211> 49  
<212> DNA  
40 <213> Artificial Sequence

45 <220>  
<223> PCR primer  
<400> 34  
50 taatttctcg agatgaagat caccgctgtc attgcccttt tattctcac 49

<210> 35  
55 <211> 33  
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

5 <220>

<223> PCR primer

<400> 35  
10 gttgccgata ctggtgtgct cccggcctct gcc 33

<210> 36

15 <211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

25 <223> PCR primer

<400> 36  
cacaccagga tcggcaactg gaataggtga ggc 33

30

<210> 37

<211> 30

35 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> PCR primer

45 <400> 37  
aacttgaaaa agcgccctccc ggcctctgcc 30

<210> 38

50 <211> 35

<212> DNA

55 <213> Artificial Sequence

<220>  
<223> PCR primer  
5 <400> 38  
ggcagaggcc gggaggcgct ttttcaagtt gggtc  
10 <210> 39  
<211> 552  
<212> DNA  
15 <213> Aspergillus nidulans  
20 <220>  
<221> CDS  
<222> (1) .. (288)  
25 <223>  
30 <220>  
<221> CDS  
<222> (508) .. (549)  
35 <223>  
40 <220>  
<221> Intron  
<222> (456) .. (507)  
45 <223>  
50 <220>  
<221> CDS  
<222> (381) .. (455)  
55 <223>

35

<220>

<221> Intron

5 <222> (289) .. (380)

<223>

10 <400> 39

atg cgc ttc atc gtc tct ctc ctc gcc ttc act gcc gcg gcc acc gca 48  
Met Arg Phe Ile Val Ser Leu Leu Ala Phe Thr Ala Ala Ala Thr Ala  
1 5 10 15

15 acc gcc ctc ccg gcc tct gcc gca aag aac gcg aag ctg gcc acc tcg 96  
Thr Ala Leu Pro Ala Ser Ala Ala Lys Asn Ala Lys Leu Ala Thr Ser  
20 25 30

20 gcg gcc ttc gcc aag cag gct gaa ggc acc acc tgc aat gtc ggc tcg 144  
Ala Ala Phe Ala Lys Gln Ala Glu Gly Thr Thr Cys Asn Val Gly Ser  
35 40 45

25 atc gct tgc tgc aac tcc ccc gct gag acc aac aac gac agt ctg ttg 192  
Ile Ala Cys Cys Asn Ser Pro Ala Glu Thr Asn Asn Asp Ser Leu Leu  
50 55 60

30 agc ggt ctg ctc ggt gct ggc ctt ctc aac ggg ctc tcg ggc aac act 240  
Ser Gly Leu Leu Gly Ala Gly Leu Leu Asn Gly Leu Ser Gly Asn Thr  
65 70 75 80

35 ggc agc gcc tgc gcc aag gcg agc ttg att gac cag ctg ggt ctg ctc 288  
Gly Ser Ala Cys Ala Lys Ala Ser Leu Ile Asp Gln Leu Gly Leu Leu  
85 90 95

40 ggtacgtgat cccactcag tcgctcccgg agaggctgag ggaagacgag cgacggtcta 348

gaaatggtgt gctaatagat gcatgtgtgc ag ctc tcg tcg acc aca ctg agg 401  
Leu Ser Ser Thr Thr Leu Arg  
100

45 aag gcc ccg tct gca aga aca tcg tcg ctt gct gcc ctg agg gaa cca 449  
Lys Ala Pro Ser Ala Arg Thr Ser Ser Leu Ala Ala Leu Arg Glu Pro  
105 110 115

50 cca acg tacgtctttc agatctgcta caagtgaggc gatcaaaact aacatattcc ag 507  
Pro Thr  
120

55 tgt gtt gcc gtc gac aac gct ggc gcc ggt acc aag gct gag taa 552  
Cys Val Ala Val Asp Asn Ala Gly Ala Gly Thr Lys Ala Glu  
125 130 135

<210> 40

<211> 135

<212> PRT

<213> Aspergillus nidulans

5

<400> 40

10 Met Arg Phe Ile Val Ser Leu Leu Ala Phe Thr Ala Ala Ala Thr Ala  
1 5 10 15

15 Thr Ala Leu Pro Ala Ser Ala Ala Lys Asn Ala Lys Leu Ala Thr Ser  
20 25 30

20 Ala Ala Phe Ala Lys Gln Ala Glu Gly Thr Thr Cys Asn Val Gly Ser  
35 40 45

Ile Ala Cys Cys Asn Ser Pro Ala Glu Thr Asn Asn Asp Ser Leu Leu  
50 55 60

25 Ser Gly Leu Leu Gly Ala Gly Leu Leu Asn Gly Leu Ser Gly Asn Thr  
65 70 75 80

30 Gly Ser Ala Cys Ala Lys Ala Ser Leu Ile Asp Gln Leu Gly Leu Leu  
85 90 95

35 Leu Ser Ser Thr Thr Leu Arg Lys Ala Pro Ser Ala Arg Thr Ser Ser  
100 105 110

40 Leu Ala Ala Leu Arg Glu Pro Pro Thr Cys Val Ala Val Asp Asn Ala  
115 120 125

Gly Ala Gly Thr Lys Ala Glu  
130 135

45 <210> 41

<211> 34

50 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

55 <220>

<223> PCR primer

<400> 41

taataaggat ccatgcgctt catcgtctct ctcc

34

<210> 42

5

<211> 129

<212> DNA

10 <213> Schizosaccharomyces pombe

<220>

15

<221> CDS

<222> (1) .. (126)

20 <223>

<400> 42

25

atg gac tca atg gct aac tcc gtt tct tcc tcc tct gtc gtc aac gct  
Met Asp Ser Met Ala Asn Ser Val Ser Ser Ser Ser Val Val Asn Ala  
1 5 10 15

48

ggc aac aag cct gct gaa act ctt aac aag acc gtt aag aat tat acc  
Gly Asn Lys Pro Ala Glu Thr Leu Asn Lys Thr Val Lys Asn Tyr Thr  
20 25 30

30

96

ccc aag gtt cct tac atg tgt gtc att gca taa  
Pro Lys Val Pro Tyr Met Cys Val Ile Ala  
35 35 40

35

129

<210> 43

40

<211> 42

<212> PRT

<213> Schizosaccharomyces pombe

45

<400> 43

Met Asp Ser Met Ala Asn Ser Val Ser Ser Ser Ser Val Val Asn Ala  
1 5 10 15

50

Gly Asn Lys Pro Ala Glu Thr Leu Asn Lys Thr Val Lys Asn Tyr Thr  
20 25 30

55

Pro Lys Val Pro Tyr Met Cys Val Ile Ala  
35 40

<210> 44  
 5 <211> 27  
 <212> DNA  
 10 <213> Schizosaccharomyces pombe  
  
 <400> 44  
 15 tataacccccca aggttcctta catgtgt 27  
  
 <210> 45  
 <211> 135  
 20 <212> DNA  
 <213> Schizosaccharomyces pombe  
 25  
 <220>  
 <221> CDS  
 30 <222> (1) .. (132)  
 <223>  
 35  
 <400> 45  
 40 atg gac tcc att gca act aac act cat tct tca tcc att gtc aat gcc 48  
 Met Asp Ser Ile Ala Thr Asn Thr His Ser Ser Ser Ile Val Asn Ala  
 1 5 10 15  
 tac aac aac aat cct acc gat gtt gta aaa act caa aac att aaa aat 96  
 Tyr Asn Asn Asn Pro Thr Asp Val Val Lys Thr Gln Asn Ile Lys Asn  
 20 25 30  
 45 tat act cca aag gtt cct tat atg tgt gta att gct taa 135  
 Tyr Thr Pro Lys Val Pro Tyr Met Cys Val Ile Ala  
 35 40  
 50  
 <210> 46  
 <211> 44  
 55 <212> PRT  
 <213> Schizosaccharomyces pombe



<400> 46

5 Met Asp Ser Ile Ala Thr Asn Thr His Ser Ser Ser Ile Val Asn Ala  
 1 5 10 15

10 Tyr Asn Asn Asn Pro Thr Asp Val Val Lys Thr Gln Asn Ile Lys Asn  
 20 25 30

Tyr Thr Pro Lys Val Pro Tyr Met Cys Val Ile Ala  
 35 40

15

<210> 47

<211> 27

20 <212> DNA

<213> Schizosaccharomyces pombe

25

<400> 47  
 tataactccaa aggttcctta tatgtgt 27

30

<210> 48

<211> 126

35 <212> DNA

<213> Schizosaccharomyces pombe

40

<220>

<221> CDS

45 <222> (1)..(123)

<223>

50

<400> 48  
 atg gac tca atg gct aac act gtt tct tcc tcc gtc gtt aac act ggc 48  
 Met Asp Ser Met Ala Asn Thr Val Ser Ser Ser Val Val Asn Thr Gly  
 1 5 10 15

55 aac aag cct tct gaa act ctt aac aag act gtt aag aat tat acc ccc 96  
 Asn Lys Pro Ser Glu Thr Leu Asn Lys Thr Val Lys Asn Tyr Thr Pro  
 20 25 30

```
aag gtt cct tac atg tgt gtc att gca taa
Lys Val Pro Tyr Met Cys Val Ile Ala
          35                      40
```

126

5

<210> 49

<211> 41

10

<212> PRT

<213> Schizosaccharomyces pombe

15

<400> 49

Met Asp Ser Met Ala Asn Thr Val Ser Ser Ser Val Val Asn Thr Gly  
1. 5 10 15

20

Asn Lys Pro Ser Glu Thr Leu Asn Lys Thr Val Lys Asn Tyr Thr Pro  
20 25 30

25

Lys Val Pro Tyr Met Cys Val Ile Ala  
35 40

30

<210> 50

<211> 27

<212> DNA

35

<213> Schizosaccharomyces pombe

40

```
<400> 50
tataccccca aggttcctta catgtgt
```

27

<210> 51

45

<211> 9

<212> PRT

50

<213> Schizosaccharomyces pombe

55

<400> 51

Tyr Thr Pro Lys Val Pro Tyr Met Cys  
1 5

<210> 52  
 <211> 586  
 5 <212> DNA  
 <213> *Aspergillus nidulans*  
 10  
 <220>  
 <221> Intron  
 15 <222> (471) .. (530)  
 <223>  
 20  
 <220>  
 <221> Intron  
 25 <222> (338) .. (389)  
 <223>  
 30  
 <400> 52  
 atgaagttct ccattgctgc cgctgtcggtt gctttcgccg cctccgtcgc ggccctccct 60  
 cctgcccattg attcccagtt cgctggcaat ggtgttgga acaagggcaa cagcaacgtc 120  
 35 aagttccctg tccccgaaaa cgtgaccgtc aagcaggcct ccgacaagtg cgggtgaccag 180  
 gccagctct cttgctgcaa caaggccacg tacgccggtg acaccacaac cgttgatgag 240  
 40 ggtcttctgt ctggtgccct cagcggcctc atcggcgccg ggtctggtgc cgaaggtctt 300  
 ggtctcttcg atcagtgtc caagcttgat gttgctggtc agttcttcga aaatcacttt 360  
 cgtgatgccc caatgctaac aattaccagt cctcattggc atccaagatc ttgtcaacca 420  
 45 gaagtgaag caaacattg cctgctgcca gaactcccc tccagcgcgg tatgttccct 480  
 tgttttacag cttattcact taaaccgatt aatctaaca cgctcacagg atggcaacct 540  
 50 tattggtgtc ggtctccctt gcgttgccct tggetccatc ctctaa 586  
 <210> 53  
 55 <211> 474  
 <212> DNA

<213> Aspergillus nidulans

5 <220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(471)

<223>

15 <400> 53

atg aag ttc tcc att gct gcc gct gtc gtt gct ttc gcc gcc tcc gtc 48  
Met Lys Phe Ser Ile Ala Ala Ala Val Val Ala Phe Ala Ala Ser Val  
1 5 10 15

20 gcg gcc ctc cct cct gcc cat gat tcc cag ttc gct ggc aat ggt gtt 96  
Ala Ala Leu Pro Pro Ala His Asp Ser Gln Phe Ala Gly Asn Gly Val  
20 25 30

25 ggc aac aag ggc aac agc aac gtc aag ttc cct gtc ccc gaa aac gtg 144  
Gly Asn Lys Gly Asn Ser Asn Val Lys Phe Pro Val Pro Glu Asn Val  
35 40 45

30 acc gtc aag cag gcc tcc gac aag tgc ggt gac cag gcc cag ctc tct 192  
Thr Val Lys Gln Ala Ser Asp Lys Cys Gly Asp Gln Ala Gln Leu Ser  
50 55 60

35 tgc tgc aac aag gcc acg tac gcc ggt gac acc aca acc gtt gat gag 240  
Cys Cys Asn Lys Ala Thr Tyr Ala Gly Asp Thr Thr Thr Val Asp Glu  
65 70 75 80

ggg ctt ctg tct ggt gcc ctc agc ggc ctc atc ggc gcc ggg tct ggt 288  
Gly Leu Leu Ser Gly Ala Leu Ser Gly Leu Ile Gly Ala Gly Ser Gly  
85 90 95

40 gcc gaa ggt ctt ggt ctc ttc gat cag tgc tcc aag ctt gat gtt gct 336  
Ala Glu Gly Leu Gly Leu Phe Asp Gln Cys Ser Lys Leu Asp Val Ala  
100 105 110

45 gtc ctc att ggc atc caa gat ctt gtc aac cag aag tgc aag caa aac 384  
Val Leu Ile Gly Ile Gln Asp Leu Val Asn Gln Lys Cys Lys Gln Asn  
115 120 125

50 att gcc tgc tgc cag aac tcc ccc tcc agc ggc gat ggc aac ctt att 432  
Ile Ala Cys Cys Gln Asn Ser Pro Ser Ser Ala Asp Gly Asn Leu Ile  
130 135 140

55 ggt gtc ggt ctc cct tgc gtt gcc ctt ggc tcc atc ctc taa 474  
Gly Val Gly Leu Pro Cys Val Ala Leu Gly Ser Ile Leu  
145 150 155

<210> 54

<211> 157  
<212> PRT  
5 <213> Aspergillus nidulans

<400> 54  
10 Met Lys Phe Ser Ile Ala Ala Ala Val Val Ala Phe Ala Ala Ser Val  
1 5 10 15  
15 Ala Ala Leu Pro Pro Ala His Asp Ser Gln Phe Ala Gly Asn Gly Val  
20 25 30  
20 Gly Asn Lys Gly Asn Ser Asn Val Lys Phe Pro Val Pro Glu Asn Val  
35 40 45  
25 Thr Val Lys Gln Ala Ser Asp Lys Cys Gly Asp Gln Ala Gln Leu Ser  
50 55 60  
30 Cys Cys Asn Lys Ala Thr Tyr Ala Gly Asp Thr Thr Thr Val Asp Glu  
65 70 75 80  
35 Gly Leu Leu Ser Gly Ala Leu Ser Gly Leu Ile Gly Ala Gly Ser Gly  
85 90 95  
40 Ala Glu Gly Leu Gly Leu Phe Asp Gln Cys Ser Lys Leu Asp Val Ala  
100 105 110  
45 Val Leu Ile Gly Ile Gln Asp Leu Val Asn Gln Lys Cys Lys Gln Asn  
115 120 125  
50 Ile Ala Cys Cys Gln Asn Ser Pro Ser Ser Ala Asp Gly Asn Leu Ile  
130 135 140  
55 Gly Val Gly Leu Pro Cys Val Ala Leu Gly Ser Ile Leu  
145 150 155  
50  
<210> 55  
<211> 420  
55 <212> DNA  
<213> Aspergillus nidulans

<220>  
 5 <221> CDS  
 <222> (1)..(417)  
 10 <223>  
 <400> 55  
 15 ctc cct cct gcc cat gat tcc cag ttc gct ggc aat ggt gtt ggc aac 48  
 Leu Pro Pro Ala His Asp Ser Gln Phe Ala Gly Asn Gly Val Gly Asn  
 1 5 10 15  
 aag ggc aac agc aac gtc aag ttc cct gtc ccc gaa aac gtg acc gtc 96  
 20 Lys Gly Asn Ser Asn Val Lys Phe Pro Val Pro Glu Asn Val Thr Val  
 20 25 30  
 aag cag gcc tcc gac aag tgc ggt gac cag gcc cag ctc tct tgc tgc 144  
 25 Lys Gln Ala Ser Asp Lys Cys Gly Asp Gln Ala Gln Leu Ser Cys Cys  
 35 40 45  
 aac aag gcc acg tac gcc ggt gac acc aca acc gtt gat gag ggt ctt 192  
 30 Asn Lys Ala Thr Tyr Ala Gly Asp Thr Thr Thr Val Asp Glu Gly Leu  
 50 55 60  
 ctg tct ggt gcc ctc agc ggc ctc atc ggc gcc ggg tct ggt gcc gaa 240  
 35 Leu Ser Gly Ala Leu Ser Gly Leu Ile Gly Ala Gly Ser Gly Ala Glu  
 65 70 75 80  
 ggt ctt ggt ctc ttc gat cag tgc tcc aag ctt gat gtt gct gtc ctc 288  
 40 Gly Leu Gly Leu Phe Asp Gln Cys Ser Lys Leu Asp Val Ala Val Leu  
 85 90 95  
 att ggc atc caa gat ctt gtc aac cag aag tgc aag caa aac att gcc 336  
 45 Ile Gly Ile Gln Asp Leu Val Asn Gln Lys Cys Lys Gln Asn Ile Ala  
 100 105 110  
 tgc tgc cag aac tcc ccc tcc agc gcg gat ggc aac ctt att ggt gtc 384  
 50 Cys Cys Gln Asn Ser Pro Ser Ser Ala Asp Gly Asn Leu Ile Gly Val  
 115 120 125  
 ggt ctc cct tgc gtt gcc ctt ggc tcc atc ctc taa 420  
 55 Gly Leu Pro Cys Val Ala Leu Gly Ser Ile Leu  
 130 135  
 <210> 56  
 <211> 139  
 <212> PRT  
 <213> *Aspergillus nidulans*

&lt;400&gt; 56

5 Leu Pro Pro Ala His Asp Ser Gln Phe Ala Gly Asn Gly Val Gly Asn  
 1 5 10 15  
 10 Lys Gly Asn Ser Asn Val Lys Phe Pro Val Pro Glu Asn Val Thr Val  
 20 25 30  
 15 Lys Gln Ala Ser Asp Lys Cys Gly Asp Gln Ala Gln Leu Ser Cys Cys  
 35 40 45  
 Asn Lys Ala Thr Tyr Ala Gly Asp Thr Thr Thr Val Asp Glu Gly Leu  
 50 55 60  
 20 Leu Ser Gly Ala Leu Ser Gly Leu Ile Gly Ala Gly Ser Gly Ala Glu  
 65 70 75 80  
 25 Gly Leu Gly Leu Phe Asp Gln Cys Ser Lys Leu Asp Val Ala Val Leu  
 85 90 95  
 30 Ile Gly Ile Gln Asp Leu Val Asn Gln Lys Cys Lys Gln Asn Ile Ala  
 100 105 110  
 35 Cys Cys Gln Asn Ser Pro Ser Ser Ala Asp Gly Asn Leu Ile Gly Val  
 115 120 125  
 Gly Leu Pro Cys Val Ala Leu Gly Ser Ile Leu  
 130 135

40

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**